



(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer : **94810255.3**

(51) Int. Cl.⁵ : **C07H 19/04, C07H 21/02, A61K 31/70**

(22) Anmeldetag : **03.05.94**

(30) Priorität : **12.05.93 CH 1467/93**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung :
30.11.94 Patentblatt 94/48

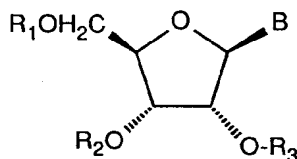
(84) Benannte Vertragsstaaten :
AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL PT SE

(71) Anmelder : **CIBA-GEIGY AG**
Klybeckstrasse 141
CH-4002 Basel (CH)

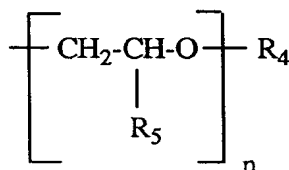
(72) Erfinder : **Martin, Pierre, Dr.**
Meisenweg 38
CH-4310 Rheinfelden (CH)

(54) **Nukleoside und Oligonukleotide mit 2'-Ethergruppen.**

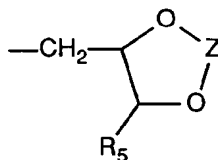
(57) Es werden Verbindungen der Formel



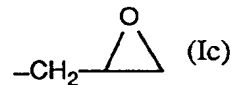
beschrieben, worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R₁ diese Bedeutungen hat und R₂ für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und R₃ einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet



(Ia)



(Ib)



(Ic)

worin R₄ Wasserstoff, C₁-C₂₁-Alkyl, C₂-C₂₁-Alkenyl, C₂-C₂₁-Alkynyl oder -C(=O)-Alkyl; R₅ Wasserstoff, C₁-C₁₀-Alkyl, -CH₂-O-R₆ oder einen Rest der Formel Ib; R₆ Wasserstoff, C₁-C₂₂-Alkyl, C₃-C₂₁-Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C₁-C₁₀-Alkyl oder -[(CH₂)₂-O]_m-R₇; R₇ Wasserstoff oder C₁-C₂₁-Alkyl; Z -(CH₂)_p- oder -(CH₂-CH-O)_q-CH₂CH₂-, wobei Z im Fall von -CH₂- unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C₁-C₁₀-Alkyl, C₅-C₆-Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C₁-C₄-Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann; n eine Zahl von 1 bis 12; m eine Zahl von 1 bis 4; p eine Zahl von 1 bis 10; und q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten.

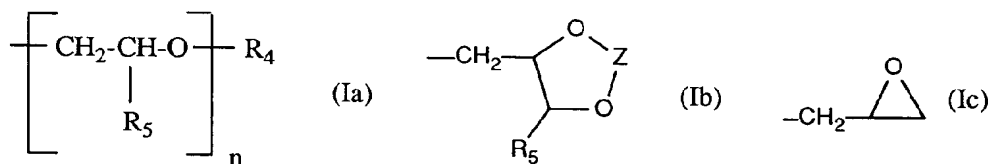
Die Erfindung betrifft Ribo-Nukleosidanalogue, deren 2'-OH Gruppe mit Polyol-Derivaten verethert ist, ein Verfahren zu deren Herstellung, Oligonukleotide mit diesen Nukleosiden und die Verwendung der Nukleoside zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Nukleosideinheiten im Molekül.

Nukleoside und Oligonukleotide haben als antivirale Wirkstoffe bzw. wegen ihrer Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Nukleinsäuren ("Antisense"-Oligonukleotide) und der damit verbundenen biologischen Aktivität breites Interesse gefunden, siehe zum Beispiel Uhlmann, E., Peyman, A., Chemical Reviews 90:543-584 (1990). Zur Bereitstellung von Nukleosiden mit neuen Eigenschaften oder zur Verbesserung der Wechselwirkung von Antisense-Oligonukleotiden mit natürlichen Nukleinsäuren sowie ihrer Stabilität gegenüber Nukleasen sind die Zuckerreste von Nukleosiden (bzw. der Nukleotideinheiten in Oligonukleotiden), oder die internukleotidische Phosphatbindung in Oligonukleotiden in unterschiedlichster Weise modifiziert worden, siehe zum Beispiel Marquez, V.E., Lim, M.I., Medicinal Research Reviews 6:1-40 (1986), Hélène, C., Toulmé, J.J., Biochimica et Biophysica Acta 1049:99-125 (1990), Englisch, U., Gauss, D.H., Angewandte Chemie 103:629-646(1991), Matteucci, M.D., Bischofberger, N., Annual Reports in Medicinal Chemistry 26:87-296(1991). In Cook, P.D., Anti-Cancer Drug Design 6:585-607 (1991) und WO 91/06556 werden Nukleoside beschrieben, die an der 2'-OH-Gruppe des Zuckers modifiziert sind. Die beschriebenen Modifikationen führen zu erhöhter Nukleaseresistenz; je länger der Alkylrest wird, umso höher wird die Nukleaseresistenz. Dabei wird mit kleinen Alkylresten wie Methyl, Ethyl oder Propyl eine schwache Erhöhung der Bindungsaffinität beobachtet, bei längeren Ketten sinkt die Bindungsaffinität aber drastisch ab. Nukleoside mit Polyol-Derivaten als Seitenketten an der 2'-OH Gruppe sind unbekannt und wurden bis anhin nie in Oligonukleotide eingebaut. Überraschenderweise erhöhen die erfindungsgemässen Modifikationen die Bindungsaffinität zur komplementären RNA nicht nur bei kürzeren sondern auch bei längeren Ketten. Dieses Ergebnis war aufgrund der publizierten Daten nicht zu erwarten. In Analogie zu den 2'-OH-modifizierten Oligoribonukleotiden zeichnen sich die erfindungsgemässen Verbindungen ebenfalls durch eine markante Nukleaseresistenz aus. Zusätzlich weisen Oligonukleotide, welche die erfindungsgemässen Nukleoside enthalten, eine erhöhte zelluläre Aufnahme auf und verfügen demzufolge über eine verbesserte Bio-Verfügbarkeit und Aktivität in vivo.

Ein Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I



worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R_1 diese Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und R_3 einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet



worin

R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl, C_2 - C_{21} -Alkynyl oder $-C(=O)$ -Alkyl;

R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-CH_2-O-R_6$ oder einen Rest der Formel Ib;

R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-[(CH_2)_2-O]_m-R_7$;

R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl;

Z $-(CH_2)_p-$ oder $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2CH_2-$, wobei Z im Fall von $-CH_2-$ unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C_1 - C_{10} -Alkyl, C_5 - C_6 -Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C_1 - C_4 -Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann;

n eine Zahl von 1 bis 12;
 m eine Zahl von 1 bis 4;
 p eine Zahl von 1 bis 10; und
 q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten;

5 wobei R_4 für den Fall $n=1$ und R_5 =Wasserstoff nicht Wasserstoff bedeutet.

In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl oder C_2 - C_{21} -Alkinyl. In einer bevorzugteren Ausführungsform bedeutet R_4 H, C_1 - C_8 -Alkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl oder C_2 - C_8 -Alkinyl. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutet R_4 H oder C_1 - C_4 -Alkyl. Beispiele für R_4 sind Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl, n, i- und t-Butyl, die Isomeren von Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl,
 10 Dodecyl, Tridecyl, Tetradecyl, Pentadecyl, Hexadecyl, Heptadecyl, Octadecyl, Nonadecyl, Undecyl, Vinyl, Allyl, But-3-en-1-yl, But-2-en-1-yl, Pentenyl, Octenyl, Dodecenyl, Octadecenyl, Ethinyl, Prop-1-in-1-yl, Prop-1-in-3-yl, But-1-in-1- oder 4-yl. Besonders bevorzugte Reste R_4 sind H, Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-Butyl. Die Zahlenwerte n betragen bevorzugt 1 bis 8, besonders bevorzugt 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3.

In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet R_5 Wasserstoff, C_1 - C_5 -Alkyl oder $-CH_2-O-R_6$, besonders
 15 bevorzugt Wasserstoff, Methyl oder $-CH_2-OH$, $-CH_2-O-C_1-C_{22}$ -Alkyl oder $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_m-C_1-C_{10}$ -alkyl, worin m eine Zahl von 1 bis 4 bedeutet.

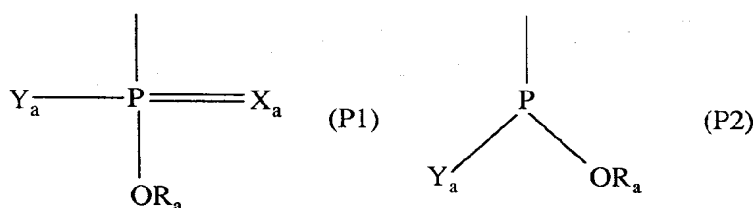
In einer bevorzugten Ausführungsform stellen R_1 und R_2 Wasserstoff dar.

Schutzgruppen und Verfahren zur Derivatisierung der Hydroxylgruppen mit solchen Schutzgruppen sind in der Zucker- und Nukleotidchemie allgemein bekannt und zum Beispiel von Greene, B.T., Protective Groups
 20 in Organic Synthesis, Wiley Interscience, New York (1991), von Sonveaux, E., Bioorganic Chemistry 14:274-325 (1986) oder von Beaucage, S.L., Iyer, R., Tetrahedron 48:2223-2311(1992) beschrieben. Beispiele für solche Schutzgruppen sind: Benzyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Brombenzyl, 2,4-Dichlorbenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(dimethoxyphenyl)methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4',4''-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Methoxyphenyl(diphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)phenylmethyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Triphenylsilyl, Alkyldiphenylsilyl, Dialkylphenylsilyl und Trialkylsilyl mit 1 bis 20, bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt
 25 1 bis 8 C-Atomen in den Alkylgruppen, zum Beispiel Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyl-dimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl; $-(C_1-C_8-Alkyl)_2Si-O-Si(C_1-C_8-Alkyl)_2$, worin Alkyl zum Beispiel Methyl, Ethyl n- und i-Propyl, n-, i- oder t-Butyl bedeutet; C_2-C_{12} -, besonders C_2-C_8 -Acyl, wie zum Beispiel Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl; $R_{S1}-SO_2$ -, worin R_{S1} C_1 - C_{12} -Alkyl, besonders C_1 - C_6 -Alkyl, C_5 - oder C_6 -Cycloalkyl, Phenyl, Benzyl, C_1 - C_{12} - und besonders C_1 - C_4 -Alkylphenyl, oder C_1 - C_{12} - und besonders C_1 - C_4 -Alkylbenzyl, oder Halogenphenyl oder Halogenbenzyl bedeutet,
 35 zum Beispiel Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; unsubstituiertes oder mit F, Cl, Br, C_1 - C_4 -Alkoxy, Tri- $(C_1-C_4-Alkyl)silyl$ oder C_1 - C_4 -Alkylsulfonyl substituiertes C_1 - C_{12} -, bevorzugt C_1 - C_8 -Alkoxycarbonyl, zum Beispiel Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxycarbonyl, 2-Trimethylsilylethoxycarbonyl, 2-Methylsulfonylethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl oder unsubstituiertes oder wie für Alkoxycarbonyl substituiertes Phenylloxycarbonyl oder Benzylloxycarbonyl,
 40 zum Beispiel Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenylloxycarbonyl oder -benzylloxycarbonyl, sowie 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl. Sofern R_1 und/oder R_2 Alkyl bedeuten, kann es mit F, Cl, Br, C_1 - C_4 -Alkoxy, Phenylloxy, Chlorphenylloxy, Methoxyphenylloxy, Benzylloxy, Methoxybenzylloxy oder Chlorphenylloxy substituiert sein. Bei R_1 und R_2 in Formel I kann es sich um gleiche oder verschiedene Schutzgruppen handeln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stellen R_1 und R_2 als Schutzgruppen Benzyl, Methyl-
 45 benzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, halogeniertes Benzyl, insbesondere Brombenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)(phenyl)-methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4',4''-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyldimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl, $-(CH_3)_2Si-O-Si(CH_3)_2$ -, $-(i-C_3H_7)_2Si-O-Si(i-C_3H_7)_2$ -, Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl; Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxycarbonyl, oder Phenylloxycarbonyl, Benzylloxycarbonyl, Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenylloxycarbonyl oder -benzylloxycarbonyl
 50 oder 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl dar. Dabei bedeuten R_1 und R_2 vorteilhafterweise gleiche Schutzgruppen.

R_2 kann als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2

5



- entsprechen, worin Y_a Wasserstoff, C_1 - C_{12} -Alkyl, C_6 - C_{12} -Aryl, C_7 - C_{20} -Aralkyl, C_7 - C_{20} -Alkaryl, $-OR_b$, $-SR_b$, $-NH_2$, Primäramino, Sekundäramino, $O^\ominus M^\oplus$ oder $S^\ominus M^\oplus$ darstellt; X_a Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R_a Wasserstoff, M^\oplus , C_1 - C_{12} -Alkyl, C_2 - C_{12} -Alkenyl, C_6 - C_{12} -Aryl, oder die Gruppe R_aO- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R_b Wasserstoff, C_1 - C_{12} -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl bedeutet; und M^\oplus für Na^\oplus , K^\oplus , Li^\oplus , NH_4^\oplus steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartenär ammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y_a , R_a und R_b unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, $-CN$, $-NO_2$, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

Y_a enthält als Primäramino bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und als Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

- Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel R_cR_dN handeln, worin R_c für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_d hat, und R_d C_1 - C_{20} -, bevorzugt C_1 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_{20} -, bevorzugt C_1 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_1 - C_6 -Aminoalkyl, C_1 - C_{20} -, bevorzugt C_1 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_1 - C_6 -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C_2 - C_{20} -, bevorzugt C_2 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_2 - C_6 -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di- $(C_1$ - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di- $(C_1$ - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- C_1 - C_6 -Alkyl darstellt, oder R_c und R_d zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, $-CH_2-NR_e-CH_2CH_2-$ oder $-CH_2CH_2-NR_{19}-CH_2CH_2-$ darstellen, worin R_e für H oder C_1 - C_4 -Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C_1 - C_4 -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C_1 - C_4 -Alkyl verethert sein.

- Unter Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärammonium ist für Y_a im Zusammenhang mit der Definition von M^\oplus ein Ion der Formel $R_fR_gR_hR_iN^\oplus$ zu verstehen, bei dem R_f C_1 - C_{20} -, bevorzugt C_1 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_1 - C_6 -Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C_2 - C_{20} -, bevorzugt C_2 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_2 - C_6 -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di- $(C_1$ - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di- $(C_1$ - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- C_1 - C_6 -Alkyl darstellt, und R_g , R_h und R_i unabhängig voneinander Wasserstoff sind oder die Bedeutung von R_f haben, oder R_f und R_g zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, $-CH_2-NR_e-CH_2CH_2-$ oder $-CH_2CH_2-NR_2-CH_2CH_2-$ darstellen, worin R_e für H oder C_1 - C_4 -Alkyl steht, und R_h und R_i unabhängig voneinander die Bedeutung von R_f haben. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C_1 - C_4 -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C_1 - C_4 -Alkyl verethert sein.

- Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder -4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl- und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Di-methoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylalkyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolethyl oder -n-propyl oder -n-butyl. R_{19} stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

- Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino und Benzoylamino sowie Piperidinyl, Piperazinyl und Morpholinyl.

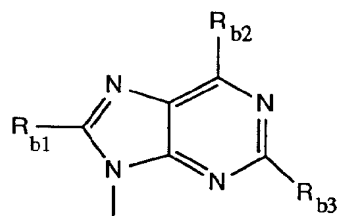
- Bevorzugte Beispiele für Primär- und Sekundärammonium sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylammonium.

- Beispiele für Y_a , R_a und R_b als Alkyl sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl und Octyl; Beispiele für Y_a , R_a und R_b als Aryl sind Phenyl und Naphthyl; Beispiele für R_a als Alkenyl sind Allyl und $(C_1$ - C_4 -Alkyl)CH=CH- CH_2 -; Beispiele für Y_a als Aralkyl sind Phenyl- C_nH_{2n} - mit n gleich einer Zahl von 1 bis 6, besonders Benzyl; Beispiele für Y_a als Alkaryl sind Mono-, Di- und Tri- $(C_1$ - C_4 -alkyl)phenyl. Bevor-

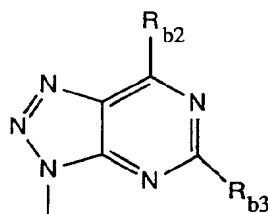
zugte Substituenten sind Chlor, Brom, Methoxy, -NO₂, -CN, 2,4-Dichlorphenyl und 4-Nitrophenyl. Beispiele für R_b sind 2,2,2-Trichlorethyl, 4-Chlorphenyl, 2-Chlorphenyl und 2,4-Dichlorphenyl; und Beispiele für R_bO- als N-Heteroaryl sind Pyrrol-N-yl, Triazol-N-yl und Benztriazol-N-yl.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutet R_a β-Cyanoethyl und stellt Y_a Di(i-propylamino) dar.

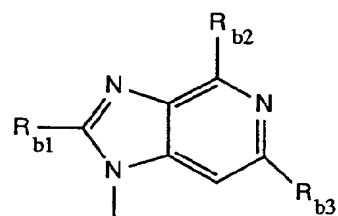
Wenn B einen Purinrest oder ein Analoges davon darstellt, so kann es sich um einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf handeln,



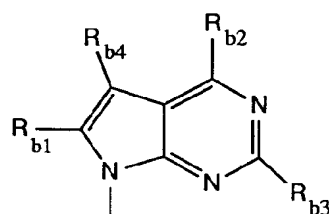
(II),



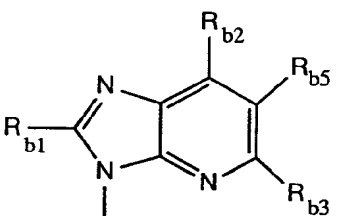
(IIa),



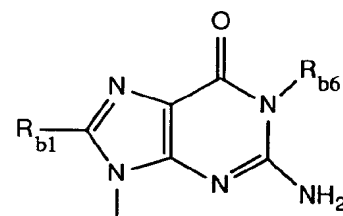
(IIb),



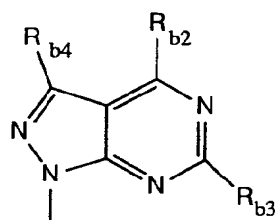
(IIc),



(IId),



(IIe),



(IIf),

worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder -O-C₁-C₁₂-Alkyl steht, und R_{b2}, R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH₂, NHNH₂, NHOH, NHO-C₁-C₁₂-Alkyl, -N=CH-N(C₁-C₁₂-Alkyl)₂, -N=CH-N-Cycloalkyl, F, Cl, Br, C₁-C₁₂-Alkyl, -Hydroxy-C₁-C₁₂-alkyl, Amino-C₁-C₁₂-alkyl, C₁-C₁₂-Alkoxy, Benzyloxy, C₁-C₁₂-Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder -C≡C-R_{b7}, R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C₁-C₄-Alkyl darstellen.

Geeignete Schutzgruppen sind zuvor erwähnt worden. Bevorzugte Schutzgruppen sind C₁-C₈-Acylgruppen, wie zum Beispiel Acetyl, Propionyl, Butyryl und Benzoyl. R_{b6} steht bevorzugt für H oder Methyl.

Das Primäramino enthält bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und das Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

Einige Beispiele für Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl, die bevorzugt 1 bis 6 C-Atome enthalten, sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl und Dodecyl, sowie entsprechende Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste. Das Alkyl,

Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl enthält besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atome. Bevorzugte Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste sind Methyl, Ethyl, n- und i-Propyl, n-, i- und t-Butyl, Methoxy, Ethoxy, Methylthio und Ethylthio, Aminomethyl, Aminoethyl, Hydroxymethyl und Hydroxyethyl.

Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel $R_{a1}R_{a2}N$ handeln, worin R_{a1} für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_{a2} hat, und R_{a2} C_1 - C_{20} -, bevorzugt C_1 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_1 - C_6 -Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C_2 - C_{20} -, bevorzugt C_2 - C_{12} - und besonders bevorzugt C_2 - C_6 -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C_1 - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C_1 - C_4 -Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- C_1 - C_6 -Alkyl darstellt, oder R_{a1} und R_{a2} zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, $-CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ oder $-CH_2CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ darstellen, worin R_{a3} für H oder C_1 - C_4 -Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C_1 - C_4 -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C_1 - C_4 -Alkyl verethert sein.

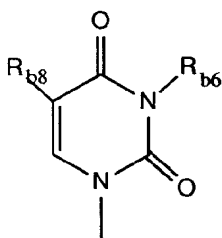
Beispiele für Alkyl sind zuvor angegeben worden. Beispiele für Aminoalkyl sind Aminomethyl, Aminoethyl, 1-Aminoprop-2-yl oder -3-yl, 1-Amino-but-2-yl oder -3-yl oder -4-yl, N-Methyl- oder N,N-Dimethyl- oder N-Ethyl- oder N,N-Diethyl- oder N-2-Hydroxyethyl- oder N,N-Di-2-hydroxyethylaminomethyl oder -aminoethyl oder -aminopropyl oder -aminobutyl. Beispiele für Hydroxyalkyl sind Hydroxymethyl, 1-Hydroxy-eth-2-yl, 1-Hydroxy-prop-2- oder -3-yl, 1-Hydroxy-but-2-yl, -3-yl oder -4-yl. Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder -4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylalkyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolylethyl oder -n-propyl oder -n-butyl. R_{a3} stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino, Isobutyrylamino und Benzoylamino.

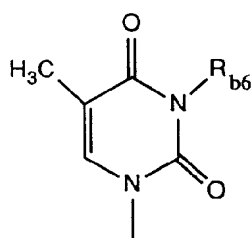
In einer bevorzugten Ausführungsform stellt R_{b1} Wasserstoff dar. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt R_{b5} Wasserstoff dar. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeuten R_{b2} und R_{b3} unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH, NH_2 , $NHOH$, $NHNH_2$, Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Isobutyrylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio.

Einige Beispiele für Analoge der Purinreihe sind neben Purin Xanthin, Hypoxanthin, Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin, N-Isobutyrylguanin. Besonders bevorzugt sind Adenin, 2-Aminoadenin und Guanin, sowie deren basengeschützte Derivate.

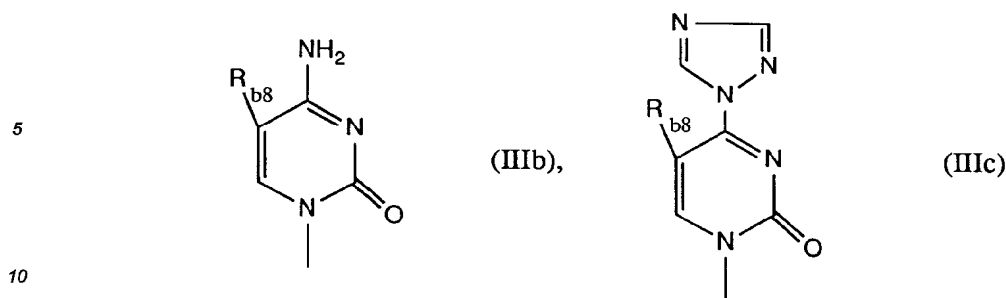
Wenn B in Formel I einen Pyrimidinrest darstellt, so handelt es sich bevorzugt um einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc



(III),



(IIIa)

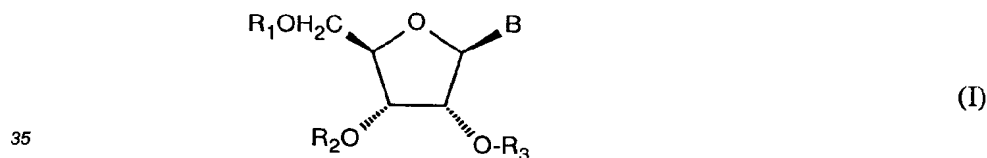


worin R_{b6} H oder C_1 - C_4 -Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, NHO - C_1 - C_{12} -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br, C_1 - C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1 - C_{12} -alkyl, Amino- C_1 - C_{12} -alkyl, C_1 - C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1 - C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C_1 - C_{12} -Alkenyl oder C_1 - C_{12} -Alkynyl bedeuten, und die NH_2 -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc. Bevorzugt stellt R_{b8} in Formel III H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino dar. Bevorzugt stellt R_{b8} in Formel IIIb und IIIc H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino dar.

R_{b6} steht bevorzugt für H oder Methyl. R_{b8} in Formel III bedeutet bevorzugt H, F, Cl, Br, NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, C_1 - C_4 -Alkyl, C_2 - C_4 -Alkenyl oder C_2 - C_4 -Alkin-1-yl. R_{b8} in Formel IIIb und IIIc stellt bevorzugt H, C_1 - C_4 -Alkyl, besonders Methyl, C_2 - C_4 -Alkenyl, besonders Vinyl oder C_2 - C_4 -Alkin-1-yl, besonders 1-Propin-1-yl, oder NH_2 , $NHCH_3$ oder $(CH_3)_2N$ dar.

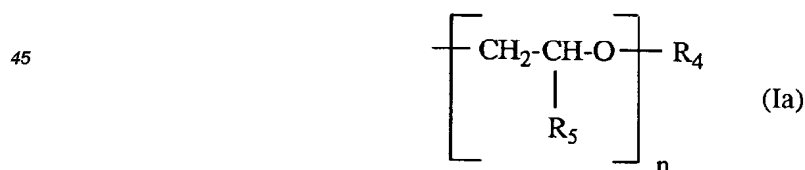
Einige Beispiele für Pyrimidinanaloga sind Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincyctosin.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,



worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R_1 diese Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und

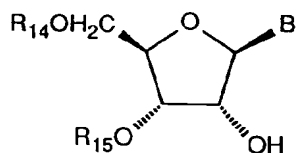
(a) R_3 einen Rest der Formel Ia bedeutet



worin R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl, C_2 - C_{21} -Alkynyl oder $-C(=O)$ -Alkyl;

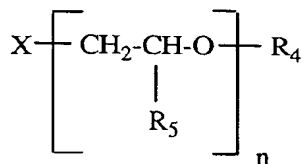
R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-CH_2-O-R_6$ oder einen Rest der Formel Ib; R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-[(CH_2)_2-O]_m-R_7$; R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl; n eine Zahl von 1 bis 12; und m eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten; wobei R_4 für den Fall $n=1$ und R_5 =Wasserstoff nicht Wasserstoff ist,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa



(IVa),

worin R_{14} und R_{15} für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umgesetzt

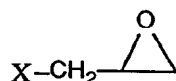


(A),

worin R_4 , R_5 und n die oben genannten Bedeutungen haben und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet; (b) R_3 einen Rest der Formel Ic bedeutet

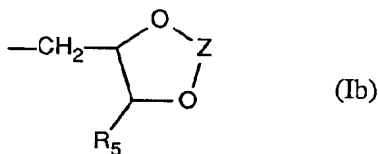


das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel B umgesetzt



(B)

worin X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet; (c) R_3 einen Rest der Formel Ib bedeutet



(Ib)

worin R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-CH_2-O-R_6$ oder einen Rest der Formel Ib; R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-[(CH_2)_2-O]_m-R_7$; R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl; Z $-(CH_2)_p-$ oder $-(CH_2-CH-O)_q-CH_2CH_2-$, wobei Z im Fall von $-CH_2-$ unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C_1 - C_{10} -Alkyl, C_5 - C_6 -Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C_1 - C_4 -Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann; m eine Zahl von 1 bis 4; p eine Zahl von 1 bis 10; und q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten;

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von H_2O und BF_3 öffnet und mit einer Verbindung der Formel $X'-(CH_2)_q-X'$ oder $X'-(CH_2-CH-O)_r-X'$, worin X' Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet, zu einem neuen Ring schliesst;

(d) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von R_6OH und BF_3 umsetzt und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt;

(e) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

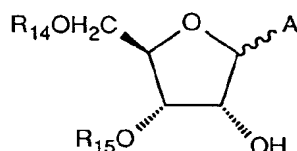
das dadurch gekennzeichnet ist, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von BF_3 und beispielsweise NaBH_4 hydriert und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt;

(f) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man das in (b) erhaltene Epoxid mit einem entsprechenden Grignard-Reagenz umsetzt und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt; oder

g) R_3 einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVb



(IVb),

worin R_{14} und R_{15} die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe, bevorzugt Alkoxy, Acyloxy, Mesyl-O, Tosyl-O und besonders bevorzugt OCH_3 , OCOCH_3 und Benzoyloxy steht, nach einem der in (a) bis (f) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und dann in an sich bekannter Weise den Basenrest B durch Substitution einführt [E. Lukevics, A. Zablocka, Nucleoside Synthesis, Ellis Horwood, New York (1991)]; gegebenenfalls die Schutzgruppen R_{14} und R_{15} abspaltet und den die phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest einführt.

Verbindungen der Formel I mit R_5 gleich Wasserstoff und $n=1$ erhält man auch durch Umsetzen einer Verbindung der Formel IVa mit einer Verbindung der Formel $\text{X}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OR}$, wenn man anschliessend die CO-Gruppe zu einer CH_2OH -Gruppe reduziert und diese dann alkyltiert.

Die Verbindungen der Formeln IVa und IVb, A und B sind bekannt, teilweise käuflich oder nach bekannten beziehungsweise analogen Verfahren herstellbar.

Inerte Lösungsmittel sind zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, Halogenkohlenwasserstoffe, alkylierte Carbonsäureamide und Lactame, Ether, Nitrile wie Acetonitril, Dialkylsulfone oder -sulfoxide oder cyclische Sulfone und Sulfoxide.

Die Reaktionstemperaturen bei den Verfahrensstufen (a) bis (g) liegen zwischen -50 bis 200°C , bevorzugt zwischen 0 bis 90°C .

Die Umsetzungen werden vorteilhaft in Gegenwart von Basen durchgeführt, zum Beispiel Alkalimetallhydriden, -alkoholaten, -hydroxiden, -carbonaten, Trialkylaminen oder Diazabicycloundecen.

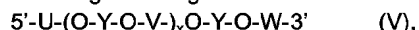
Die Reduktion kann zum Beispiel katalytisch oder mit Borhydriden vorgenommen werden.

Die Isolierung der Verbindungen der Formel I und deren Reinigung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren wie zum Beispiel Fällung oder Kristallisation und Filtration und chromatographischen Methoden.

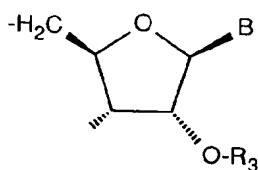
Aus den Verbindungen der Formel I können Oligonukleotide aufgebaut werden, die auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Nukleinsäuren wertvolle biologische Aktivitäten aufweisen, und als pharmazeutische Wirkstoffe oder als Diagnostika verwendet werden können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Verbindungen der Formel I zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten, jedoch mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formel I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden, wobei die Oligonukleotide 2 bis 200 Monomereinheiten enthalten. Bevorzugt enthalten die Oligonukleotide 2 bis 100, besonders bevorzugt 2 bis 50, und insbesondere bevorzugt 4 bis 30 Monomereinheiten. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten. Bevorzugt sind ferner Oligonukleotide, die zusätzlich Monomereinheiten von synthetischen oder natürlichen Nukleosiden enthalten, die sich von D-Ribose oder 2-Desoxyribose ableiten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Oligonukleotide der Formel V



worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI



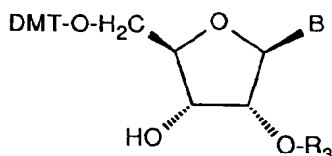
(VI)

bedeutet, und B und R_3 die für die Verbindungen der Formel I angegebenen Bedeutungen haben einschliesslich der Bevorzugungen und Beispiele.

Eine bevorzugte Brückengruppe Y ist die in natürlichen Oligonukleotiden vorkommende Gruppe $-P(O)O^{\ominus}-$. Beispiele für weitere Brückengruppen sind $-P(O)S^{\ominus}-$, $-P(S)S^{\ominus}-$, $-P(O)R_{16}-$, $P(O)NR_{17}R_{18}$, oder $-CH_2-$, worin R_{16} H oder C_1-C_6 -Alkyl darstellt und R_{17} und R_{18} unabhängig voneinander die Bedeutung von R_{16} haben. In Formel V steht x bevorzugt für eine Zahl von 0 bis 100, besonders bevorzugt für eine Zahl von 1 bis 50 und insbesondere bevorzugt für eine Zahl von 3 bis 29. Die Reste der Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder die Reste der Formel VI können zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sein, oder es können Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen.

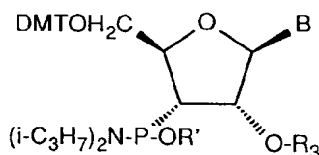
Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform sind Oligonukleotide der Formel V, worin x eine Zahl von 2 bis 50, bevorzugt 2 bis 30 darstellt, Y für die Gruppe $-P(O)O^{\ominus}-$ steht, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste eines natürlichen Nukleosids bedeuten und mindestens einer der Reste U, V oder W der Formel VI entspricht. Als natürliche Nukleoside kommen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin, 2-Aminoadenin, 5-Methylcytosin, 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxyguanosin und Thymidin in Frage. Als natürliche Nukleosidbasen sind besonders Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil zu nennen. Die Reste der Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen Nukleosiden gebunden sind, oder Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform von Oligonukleotiden der Formel V entsprechen sämtliche Reste U, V und W gleichen oder verschiedenen Resten der Formel VI. Bevorzugt stellt x eine Zahl von 3 bis 29 dar und bevorzugt sind insgesamt 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten.

Die Herstellung der erfindungsgemässen Oligonukleotide kann in an sich bekannter Weise nach verschiedenen Verfahren in gegebenenfalls automatisierten und zusammen mit Verfahrensvorschriften käuflichen DNA-Synthesizern erfolgen. Im Falle der Brückengruppe $-P(O)O^{\ominus}-$ kann zum Beispiel das Phosphortriesterverfahren, das Phosphittriesterverfahren oder das H-Phosphonatverfahren angewendet werden, die dem Fachmann geläufig sind. Beim Phosphittriesterverfahren kann man zum Beispiel so vorgehen, dass man die Nukleoside der Formel I, worin R_1 und R_2 je H bedeuten, mit einem Schutzgruppeure agenz, zum Beispiel 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-chlorid zu einem Nukleosid der Formel D umsetzt



(D),

und die Verbindung der Formel D mit Hilfe eines "linkers", zum Beispiel Bernsteinsäureanhydrid, an ein festes Trägermaterial bindet, zum Beispiel an Controlled Pore Glass (CPG), das langkettige Alkylaminogruppen enthält. In einem separaten Verfahren wird die Hydroxylgruppe der Verbindung der Formel D derivatisiert, zum Beispiel zu einem Phosphoramidit unter Verwendung von $R'OP[N(i\text{-Propyl})_2]_2$ zu einer Verbindung der Formel E



(E)

wobei R' zum Beispiel β -Cyanoethyl darstellt.

Nach dem Abspalten der Schutzgruppe wie zum Beispiel der DMT-Gruppe des an den Träger gebundenen Materials koppelt man unter Abspaltung von $-N(i-C_3H_7)_2$ mit der Verbindung der Formel D, blockiert eventuell vorhandene freie Hydroxylgruppen (capping) und oxidiert dann das gebildete Phosphit zum Phosphat. Nach dem Entschützen des Dimeren wiederholt man den Reaktionszyklus mit einer Verbindung der Formel E, bis man ein Oligomer mit der gewünschten Anzahl an Monomereinheiten synthetisiert hat, und löst das Produkt vom Trägermaterial ab. Auf diese Weise erhält man Oligonukleotide, in denen sämtliche Reste U, V und W gemäss Formel V aus Resten der Formel VI bestehen. Auf diese Weise sind auch Oligonukleotide mit beliebigen Monomereinheiten in beliebiger Sequenz herstellbar, je nach Verwendung synthetischer, natürlicher und erfindungsgemässer Nukleosidbausteine in den einzelnen Reaktionszyklen.

Die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I, worin R_1 und R_2 je H bedeuten, weisen antivirale und antiproliferative Eigenschaften auf und können demgemäss als Arzneimittel Verwendung finden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide weisen zudem eine hohe Stabilität gegenüber einem Abbau durch Nukleasen auf. Besonders überraschend ist ihre ausgezeichnete Paarung mit komplementären Nukleinsäuresträngen, vor allem vom RNA-Typ. Zusätzlich zeigen sie eine unerwartet hohe zelluläre Aufnahme. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich daher besonders für die Antisense-Technologie, das heisst zur Inhibition der Expression unerwünschter Proteinprodukte durch die Bindung an geeignete komplementäre Nukleotidsequenzen von mRNA (EP 266,099, WO 87/07300 und WO 89/08146). Sie können zur Behandlung von Infektionen und Krankheiten zum Beispiel durch die Blockierung der Expression von bioaktiven Proteinen auf der Stufe der Nukleinsäuren (zum Beispiel Onkogene) eingesetzt werden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich auch als Diagnostika und können als Gensonden zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten durch selektive Interaktion auf der Stufe von einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren verwendet werden ("gene probes"). Im besonderen - bedingt durch die erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen - ist eine diagnostische Anwendung nicht nur in vitro sondern auch in vivo (zum Beispiel Gewebeproben, Blutplasma und Blutserum) möglich. Solche Verwendungsmöglichkeiten sind zum Beispiel in der WO 91/06556 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen Oligonukleotide als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft auch die erfindungsgemässen Nukleoside der Formeln I sowie der Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Inaktivierung von Nukleotidsequenzen im Körper. Die Dosierung bei Verabreichung an Warmblüter von etwa 70 kg Körpergewicht kann zum Beispiel 0,01 bis 1000 mg pro Tag betragen. Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in Form pharmazeutischer Präparate parenteral, zum Beispiel intravenös oder intraperitoneal.

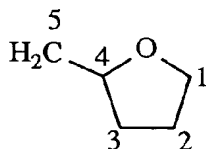
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formeln V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial vorzugsweise in einer signifikanten Menge und gegebenenfalls Hilfsstoffe.

Man kann die pharmakologisch wirksamen erfindungsgemässen Nukleoside und Oligonukleotide in Form von parenteral verabreichbaren Präparaten oder von Infusionslösungen verwenden. Solche Lösungen sind vorzugsweise isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, wobei diese zum Beispiel bei lyophilisierten Präparaten, welche die Wirksubstanz allein oder zusammen mit einem Trägermaterial, zum Beispiel Mannit, enthalten, vor Gebrauch hergestellt werden können. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe, zum Beispiel Konservier-, Stabilisier-, Netz- und/oder Emulgiermittel, Löslichkeitsvermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer enthalten. Die pharmazeutischen Präparate, die gewünschtenfalls weitere pharmakologisch wirksame Stoffe wie zum Beispiel Antibiotika enthalten können, werden in an sich bekannter Weise, zum Beispiel mittels konventioneller Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren, hergestellt, und enthalten etwa 0,1 % bis 90 %, insbesondere von etwa 0,5 % bis etwa 30 %, zum Beispiel 1 % bis 5 % Aktivstoff(e).

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Den 1H -NMR-Spektren liegt die Nummerierung der Kohlenstoffatome in den folgenden cyclischen Kohlenstoffgerüsten zu Grunde:

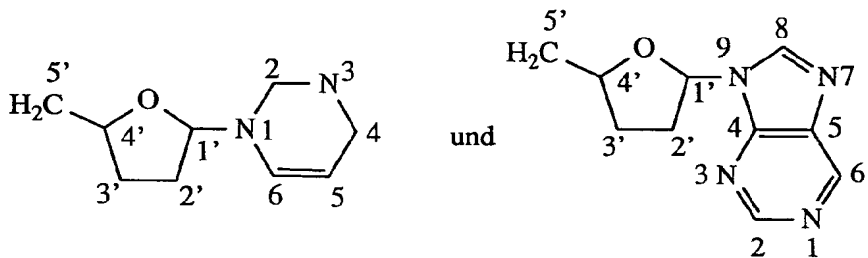
Ausgangsverbindungen:

5



10 Nukleoside (Beispiele):

15



20

Verwendete Abkürzungen im Text und in den Formeln:

DMF	Dimethylformamid
ClBnCl ₂	2,4-Dichlorbenzylchlorid
25 Bn	Benzyl
Ac	Acetyl
φ	Phenyl
BSA	N,N-Bis(trimethylsilyl)acetamid
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
30 BOM-Cl	Benzyloxymethylchlorid
DMTCI	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
THF	Tetrahydrofuran

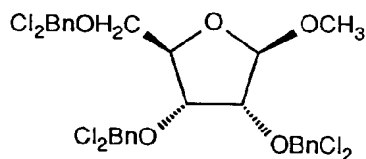
A) Herstellung von Nukleosid-Analogen

35

Beispiel A1:

Zu einer Vorlage von 13,5 g NaH in 130 ml DMF werden bei 60°C 28,0 g 1-Methylribose zugetropft. Nach Ende der H₂-Entwicklung werden 110,0 g ClBnCl₂ zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 16 Stunden bei 25°C weitergerührt. Um noch vorhandenes NaH zu zerstören tropft man vorsichtig Methanol zu und giesst das Reaktionsgemisch dann auf Eis/Wasser. Der klumpige Niederschlag wird abfiltriert und mit Acetonitril gut nachgewaschen. Man erhält die Verbindung (A1).

45



(A1).

50

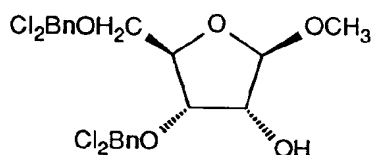
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 5,0 ppm als Singulett.
MS: 638 (M⁺)

Beispiel A2:

55

65,9 g des in Beispiel A1 hergestellten Produktes werden in 600 ml Methylenechlorid gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann tropft man 121 ml SnCl₄ in 800 ml Methylenechlorid zu und lässt bei 3°C stehen. Nach 26 Stunden werden nochmals 2 ml SnCl₄ zugegeben. Nach total 35 Stunden wird die Reaktionslösung vorsichtig auf 700

ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gegossen. Nach Verdünnung mit 400 ml Methylenchlorid wird der Sn-haltige Niederschlag abfiltriert. Die organische Phase des Filtrats wird mit MgSO_4 getrocknet und zur Verbindung (A2) eingedampft.

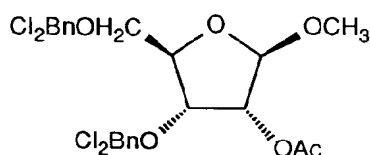


(A2).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 4,90 ppm als Doublett mit $J=5$ Hz.

Beispiel A3:

125,9 g des in Beispiel A2 erhaltenen Produktes werden in 1 l Pyridin gelöst. Bei 20°C werden 25,5 g Acetanhydrid und 1 g 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Anschliessend wird 17 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in 1 l Wasser aufgenommen, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Hexan zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A3).



(A3).

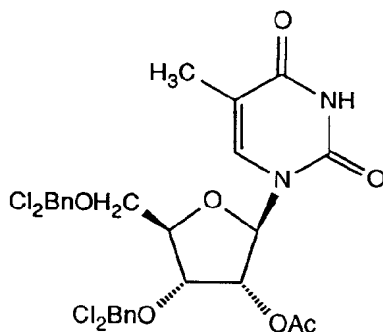
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 5,15 [d, $J=4,5$ Hz, $\underline{\text{H-C(1)}}$]; 3,50 (s, $\underline{\text{OCH}_3}$); 2,17 (s, $\underline{\text{OCOCH}_3}$);

MS: 522 (M^+)

$[\alpha]_{\text{Na(D)}}=87,4\pm1,0^\circ$, CHCl_3 (0,998%)

Beispiel A4:

24 g Thymin werden in 100 ml 1,2-Dichlorethan aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 116,4 g BSA wird unter Rückfluss erhitzt bis eine klare Lösung entsteht. Danach wird auf 50°C abgekühlt und es werden 50 g des in Beispiel A3 hergestellten Produktes sowie 27,5 g Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester zugegeben. Es wird während 20 Stunden bei 70°C gerührt und anschliessend auf 300 ml NaHCO_3 -Lösung gegossen und gerührt. Nach Extraktion mit Dichlorethan wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Methanol zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A4).



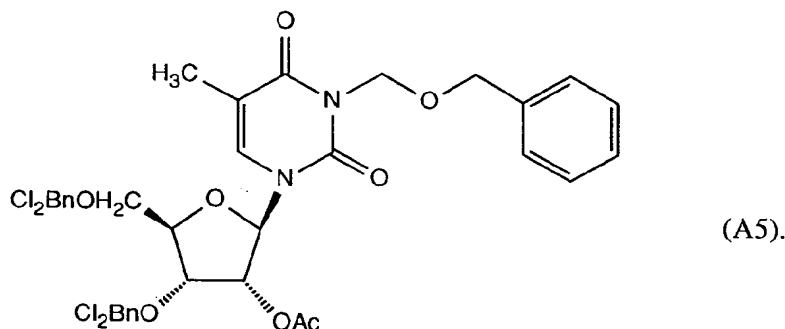
(A4).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 8,25 (s, $\underline{\text{NH}}$); 6,10 [d, $J=4,5$ Hz, $\underline{\text{H-C(1)'}}$]; 2,13 (s, $\underline{\text{OCOCH}_3}$); 1,66 (s, $\underline{\text{CH}_3}$)

MS: 616 (M^+)

Beispiel A5:

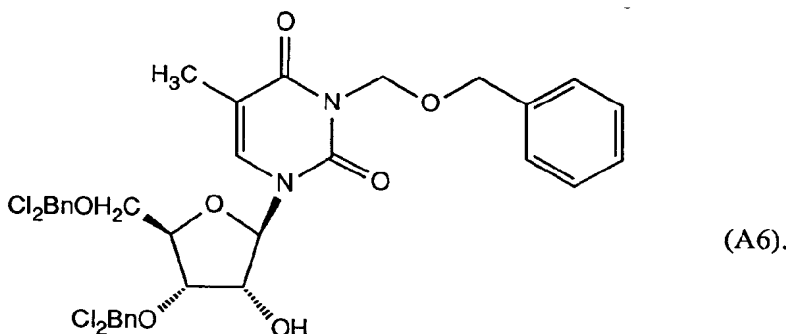
85 g des in Beispiel A4 hergestellten Produktes werden in 850 ml Acetonitril suspendiert. Es werden bei Raumtemperatur 24,2 g DBU und 24,9 g BOM-Cl zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A5).



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 6,05 [d, $J=4,5$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 5,5 (AB, CH_2); 5,37 [dd, $\text{H-C}(2')$]; 2,13 (s, OCOCH_3); 1,55 (s, CH_3)
 MS: 736 (M^+)

Beispiel A6:

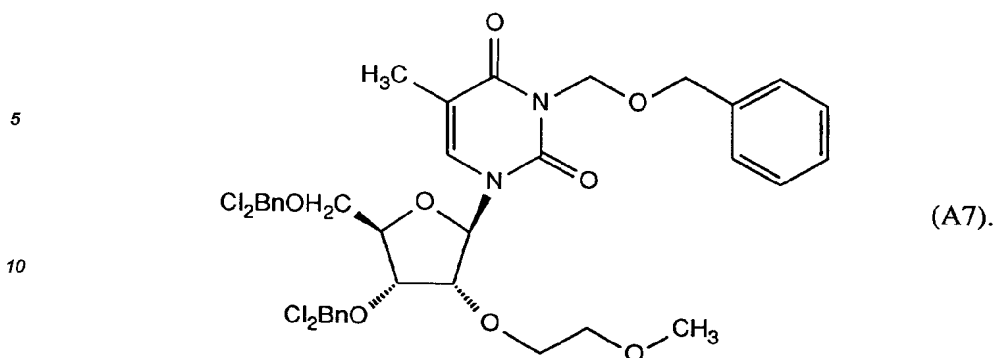
106 g des in Beispiel A5 hergestellten Produktes werden in 1 l THF suspendiert. Es werden 26 g einer 30 %igen $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -Lösung zugetropft. Nach 2,5 Stunden Rühren wird die Reaktionslösung auf Wasser gegossen, mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung versetzt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung mit MgSO_4 wird der Extrakt eingedampft. Man erhält die Verbindung (A6).



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 5,93 [d, $J=5$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 5,5 (AB, CH_2); 3,03 (d, $J=6,5$ Hz, OH); 1,72 (s, CH_3)
 MS: 694 (M^+)

Beispiel A7:

20,3 g des in Beispiel A6 erhaltenen Produktes werden in 200 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 0,73 g NaH wird 30 min gekocht. Anschliessend werden 2,89 g 2-Chlorethylmethylether zugegeben und es wird 24 Stunden weitergekocht. Anschliessend werden nochmals 0,5 g NaH und 1,7 g 2-Chlorethylmethylether zugegeben und weitergekocht. Nach insgesamt 32 Stunden wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Toluol/Essigsäureethylester (4:1) chromatographiert. Man erhält die Verbindung (A7).

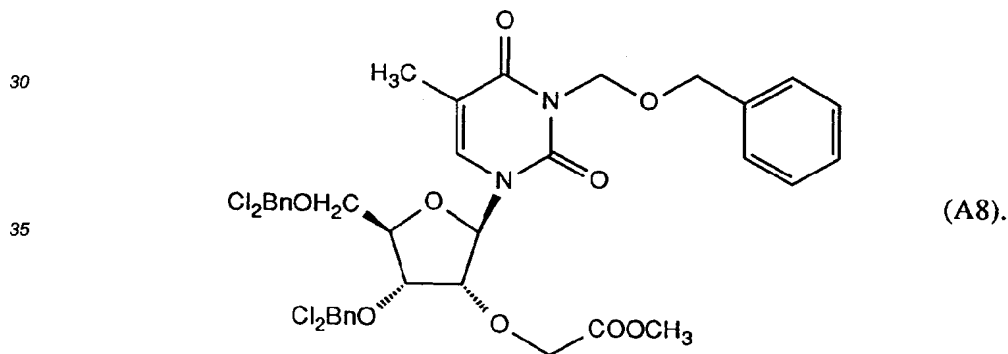


15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,65 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,93 [s, $\text{H-C}(1')$]; 5,5 (s, CH_2); 3,33 (s, OCH_3); 1,6 (s, CH_3).
MS: 752 (M^+).

Beispiel A8:

20 79,4 g des in Beispiel A6 erhaltenen Produktes werden in 800 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 3,3 g NaH wird kurz aufgekocht und anschliessend werden bei 40°C 21 g Bromessigsäuremethylester zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird insgesamt 27 Stunden bei 60°C gerührt, wobei nach 16 Stunden und nach 20 Stunden je 1 g NaH und 2 ml Bromessigsäuremethylester zugegeben werden. Schliesslich wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Dabei erhält man die Verbindung (A8).

25

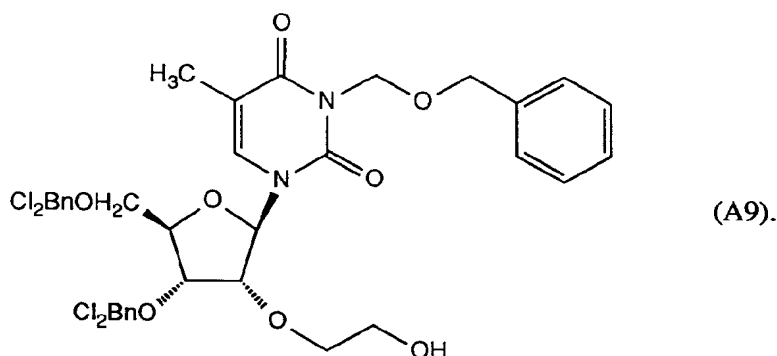


40 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,70 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,92 [s, $\text{H-C}(1')$]; 5,48 (AB, CH_2); 3,75 (s, OCH_3); 1,58 (s, CH_3).
MS: 766 (M^+).

Beispiel A9:

45 a) 37 g des gemäss Beispiel A8 gewonnenen Produktes werden in 400 ml THF gelöst. Man gibt bei 20°C portionsweise 1,5 g LiBH_4 zu und rührt 1 Stunde lang. Danach giesst man das Reaktionsgemisch vorsichtig auf 500 ml Wasser und neutralisiert mit 32 ml 2 N wässriger Salzsäure. Nach Extraktion mit Essigsäureethylester und Eindampfen erhält man die Verbindung (A9).

50



15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,65 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,96 [s, $\text{H-C}(1')$]; 5,50 (AB, CH_2); 2,57 (breites s, OH); 1,60 (s, CH_3).

MS: 738 (M^+).

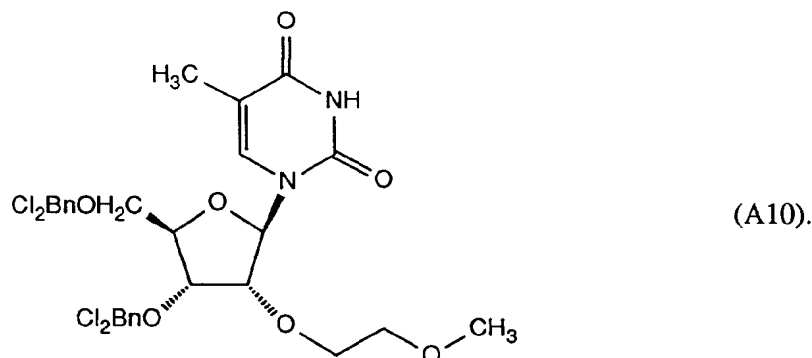
b) Die Verbindung (A9) wird mit CH_3J in Gegenwart von NaH in THF bei 70°C methyliert. Nach 8 Stunden wird wie in Beispiel A7 beschrieben aufgearbeitet. Man erhält die Verbindung (A7).

20

Beispiel A10:

20,0 g des in Beispiel A7 hergestellten Produktes werden in 200 ml THF gelöst und über 2 g Pd/C (5%) bei 25°C und unter Normaldruck 4,5 Stunden hydriert (H_2 -Aufnahme 102 %). Nach Filtration und Eindampfen des Filtrats wird der Rückstand in 170 ml Methanol gelöst und mit einer 30%igen $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -Lösung auf einen pH-Wert von 11 eingestellt. Nach 24 Stunden giesst man auf 250 ml Wasser, säuert mit 2 N wässriger Salzsäure an und extrahiert mit Essigsäureethylester. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A10).

25

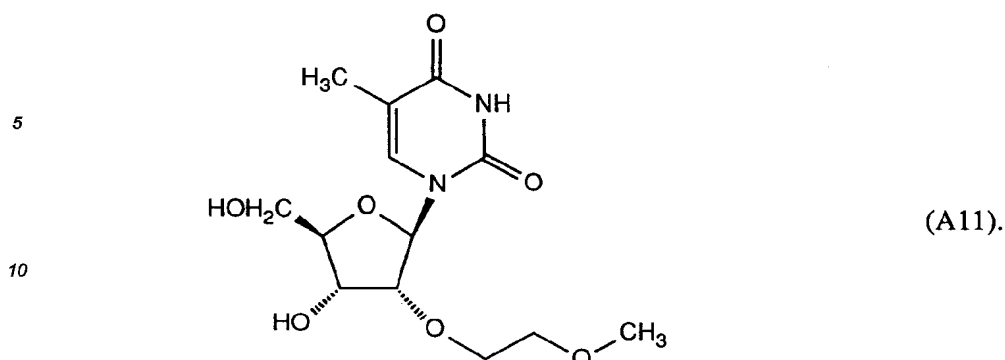


45 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 8,75 (s, NH); 7,65 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,97 [s, $\text{H-C}(1')$]; 3,33 (s, OCH_3); 1,60 (s, CH_3).
MS: 632 (M^+).

Beispiel A11:

15 g des in Beispiel A10 hergestellten Produktes werden in 250 ml Methanol in Gegenwart von 9,25 g wasserfreiem Natriumacetat über 5 g Pd/C (5%) bei 50°C und unter Normaldruck hydriert. Nach 46 Stunden wird das Hydriergemisch filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung von Salzen über eine kleine Fritte mit Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol 9:1). Man erhält die Verbindung (A11).

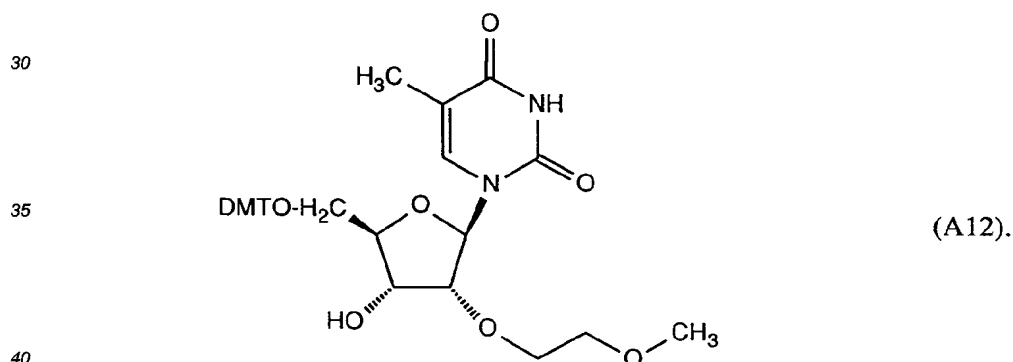
50



15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 11,5 (s, NH); 7,95 [s, $\text{H-C}(6)$]; 6,00 [d, $J=6$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 5,33 (breites s, OH); 5,20 (d, OH); 3,32 (s, OCH_3); 1,92 (s, CH_3).
MS: 316 (M^+).

20 Beispiel A12:

0,45 g des in Beispiel A11 hergestellten Produktes werden zweimal in Pyridin aufgenommen und eingedampft. Man nimmt erneut in 18 ml Pyridin auf und gibt nun der Reihe nach zu: 0,2 g Triethylamin, 0,55 g DMTCl und 25 mg 4-Dimethylamino-pyridin. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml Essigsäureethylester verdünnt und auf 50 ml Wasser gegossen. Die organische Phase wird
25 mit MgSO_4 getrocknet und eingengt. Den Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Hexan/Essigsäureethylester/Triethylamin 86:10:4). Man erhält die Verbindung (A12).

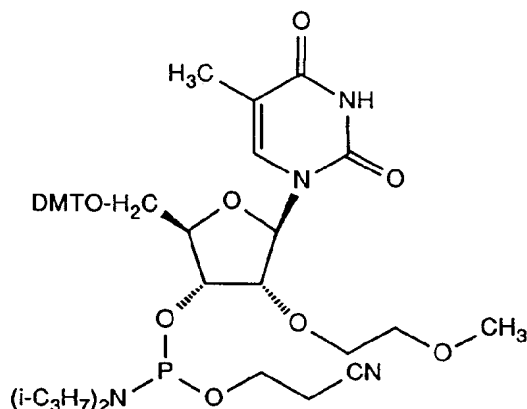


$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,62 [s, $\text{H-C}(6)$]; 6,02 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 3,38 (s, OCH_3); 1,36 (s, CH_3).

45 Beispiel A13:

330 mg des in Beispiel A12 erhaltenen Produktes werden zu einer Vorlage aus 110 mg Diisopropylammoniumtetrazolid, 178 mg 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit und 6 ml Methylenchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach auf eine gesättigte wässrige NaHCO_3 -Lösung gegossen. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Den
50 Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Ethanol/Essigsäureethylester 4:1 mit 1 % Zusatz von Triethylamin). Der erhaltenen Schaum wird in 1 ml Methyl-t-butylether gelöst und bei 0°C in Pentan getropft. Man erhält die Verbindung (A13) (Diastereoisomere, 1:1).

55

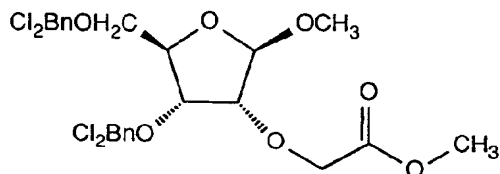


(A13).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,70 [s, $\text{H-C}(6)$] und 7,63 [s, $\text{H-C}(6)$]; 6,08 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1)$]; 6,02 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1')$].

Beispiel 14:

24,2 g des in Beispiel A2 erhaltenen Produktes werden in 250 ml THF gelöst. Es werden 8,76 g Bromessigsäuremethylester und 1,38 g NaH zugegeben, und nun rührt man das Reaktionsgemisch 3,5 Stunden bei 60°C . Nach erneuter Zugabe von 0,14 g NaH und 0,53 ml Bromessigsäuremethylester wird weiter 3 Stunden bei 60°C gerührt. Danach giesst man die Suspension auf 300 ml Wasser, neutralisiert mit 2 N wässriger Salzsäure und extrahiert mit Essigsäureethylester. Der Extrakt wird über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A14).



(A14).

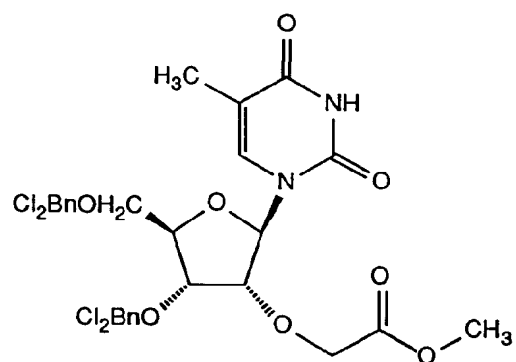
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 5,05 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 3,50 [s, OCH_3] und 3,75 [s, OCH_3].
MS: 552 (M^+).

Beispiel A15:

5,0 g des in Beispiel A14 erhaltenen Produktes werden in 60 ml Acetonitril gelöst. Nun gibt man 4,88 g bisilyliertes Thymin zu und tropft unter Rühren bei 60°C 2,6 g Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester ein. Nach 3,5 Stunden Rühren wird die Reaktionslösung abgekühlt, auf eine gesättigte wässrige NaHCO_3 -Lösung gegossen und verrührt. Nun wird mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Toluol/Essigsäureethylester 1:1). Man erhält die Verbindung (A15).

5

10



(A15).

15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 8,36 (s, NH); 7,70 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,94 [d, $J=1,5\text{Hz}$, $\text{H-C}(1')$]; 3,73 (s, OCH_3); 1,58 [s, CH_3].

MS: 646 (M^+).

b) Die Umsetzung mit Benzyloxymethylchlorid ergibt die Verbindung (A8).

20 Beispiel A16:

Analog der vorstehenden Arbeitsvorschriften werden weitere 2'-OH-Modifikationen vorgenommen und in Tabelle 1 aufgeführt.

25

30

35

40

45

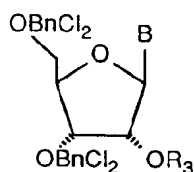
50

55

Tabelle 1:

Beispiele für weitere 2'-OH-Modifikationen


(a)

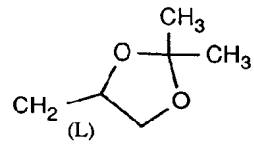
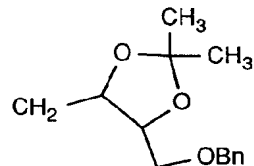
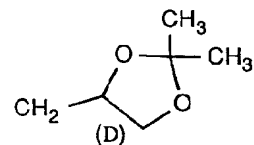
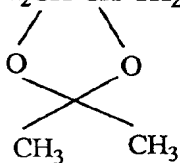
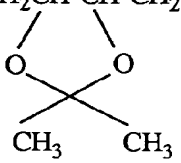
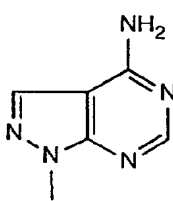


B

R₃

H-C(1')

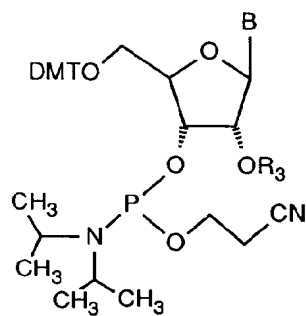
UBOM	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	5,93 (s)
UBOM	(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₃	5,93 (s)
UBOM	CH ₂ COOCH ₃	5,89 (d, J< 1,5 Hz)
TBOM	(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₃	5,97 (s)
TBOM	(CH ₂ CH ₂ O) ₄ CH ₃	5,96 (s)
TBOM	CH ₂ CH ₂ OH	5,96 (s)
TBOM	CH ₂ CH ₂ OAc	5,98 (d, J=2 Hz)
TBOM	CH ₂ COOCH ₃	5,92 (s)
TBOM	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	5,93 (s)
TBOM	(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₃	5,96 (d, J=2 Hz)
TBOM	CH ₂ CH(OH)CH ₃	5,92 (s)
TBOM	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	5,94 (brs)
TBOM	CH ₂ CH(OCH ₃)CH ₃	5,97 (s)
TBOM	(CH ₂ CH ₂ O) ₃ C ₁₀ H ₂₁	5,93 (d, J=1,5 Hz)
TBOM	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OC ₁₆ H ₃₃	5,93 (s)
TBOM	CH ₂ CH(OCH ₃)CH ₂ OC ₁₆ H ₃₃	5,97 (d, 1,5 Hz)
TBOM	CH ₂ CH(OAc)CH ₂ O(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₃	5,93 (s)
TBOM	CH ₂ CH(OH)CH ₂ O(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₃	5,98 (d, J=1,5 Hz)
TBOM	CH ₂ —  (R)	5,91 (s)

5	B	R ₃	H-C(1')
10	T ^{BOM}		5,93 (s)
15	T ^{BOM}		5,94 (d, J=2 Hz)
20	T ^{BOM}		5,91 (s)
25	6-OBn, 2-NH ₂ -Purin	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	6,09 (d, J=5 Hz)
	6-Cl, 2 Cl-Purin	CH ₂ CH ₂ OH	5,77 (d, J=7 Hz)
	6-Cl, 2 Cl-Purin	CH ₂ COOCH ₃	6,32 (d, J=4 Hz)
30	T ^{BOM}	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OCH ₂ CH ₂ C ₆ F ₁₃	5,94 (d, J=2 Hz)
	T ^{BOM}	CH ₂ CH(OCH ₃)CH ₂ OCH ₃	5,93 (d, J=2 Hz)
		CH ₂ CH(OH)CH ₂ OCH ₂ CH-CH-CH ₂ OBn	
35	T ^{BOM}		5,92 (d, J=1,5 Hz)
40		CH ₂ CH(OCH ₃)CH ₂ OCH ₂ CH-CH-CH ₂ OBn	
45	T ^{BOM}		5,90 (d, J=1,5 Hz)
50		CH ₂ COOCH ₃	6,63 (d, 5 Hz)
55			

5

(b)

10



15

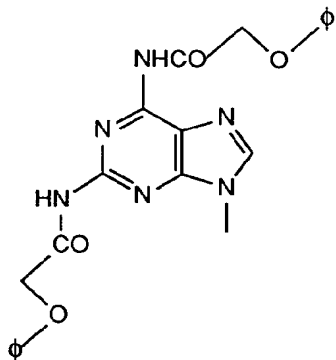
B

 R_3 δ in ^{31}P -NMR (ppm)

20

25

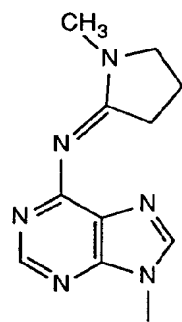
30

 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$

150,18; 150,01

35

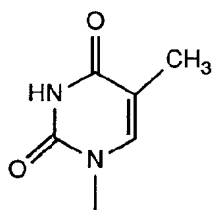
40

 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$

149,87; 150,42

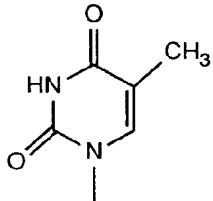
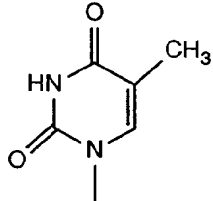
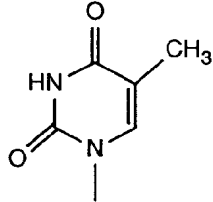
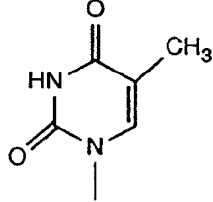
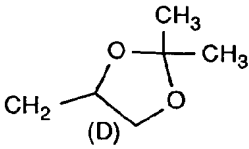
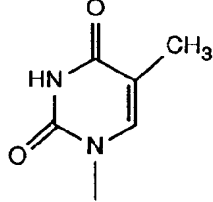
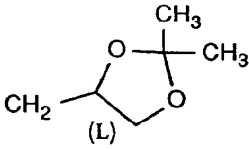
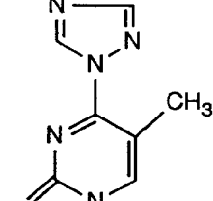

45

50

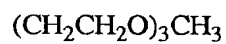
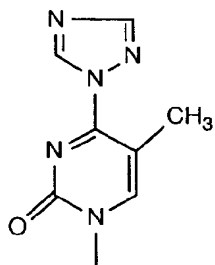
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$

150,14; 150,02

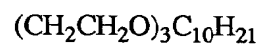
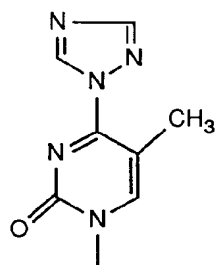
55

B	R ₃	δ im ³¹ P-NMR (ppm)
5		
10		(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₃ 149,95; 149,88
15		(CH ₂ CH ₂ O) ₃ C ₁₀ H ₂₁ 150,12; 150,06
20		CH ₂ CH(OMe)CH ₂ OC ₁₆ H ₃₃ 150,10; 150,01
25		 150,09; 150,02
30		 150,08; 149,91
35		CH ₂ CH ₂ OCH ₃ 150,25; 149,43
40		
45		
50		
55		

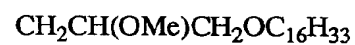
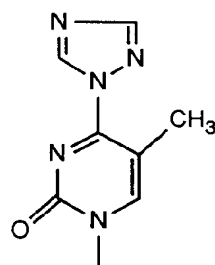
B	R ₃	δ in ³¹ P-NMR (ppm)
5		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		



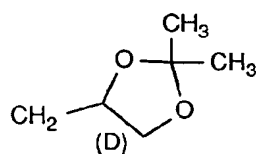
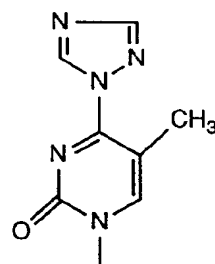
150,34; 149,47



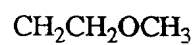
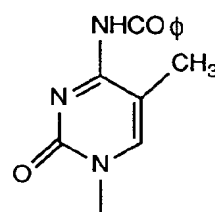
150,48; 149,60



150,73; 149,33



150,80; 149,61



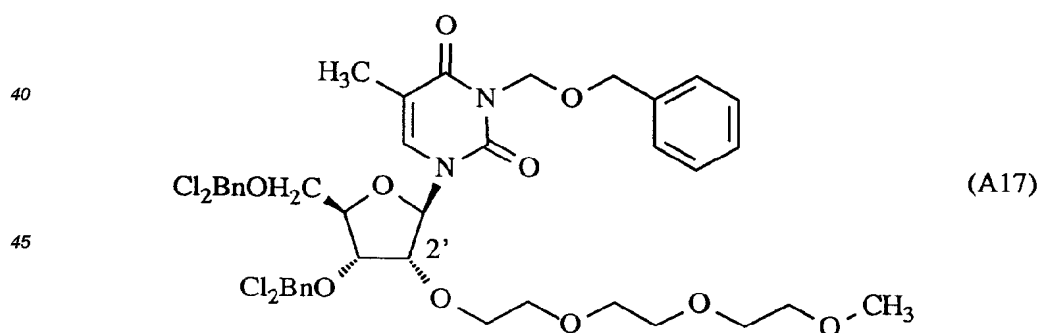
150,17; 150,09

B	R_3	δ in ^{31}P -NMR (ppm)
5		
10		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 150,19; 149,76
15		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 149,51; 149,23
20		
25		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 150,60; 150,18
30		
35		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 151,18; 149,49
40		
45		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}-\text{OCH}_3 \end{array}$ 150,82; 150,74
50		
55		

B	R ₃	δ im ³¹ P-NMR (ppm)
<div data-bbox="284 367 487 556"> </div>	CH ₂ CH(OCH ₃)CH ₂ OCH ₃	150,92; 150,76
<div data-bbox="284 588 633 892"> </div>	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	150,71; 150,96

Beispiel A17:

5,0 g des in Beispiel A6 hergestellten Produktes werden in 50 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 0,21 g NaH wird das Reaktionsgemisch während 45 Minuten auf 60°C erwärmt, dann mit 1,57 g Diethylenglykol-chlorethyl-methylether versetzt und schliesslich total 54 Stunden bei 60°C weitergerührt. Nach der 8. und 42. Stunde gibt man erneut 0,05 g NaH und 0,4 g des Diethylenglykol-chlorethyl-methylethers zu. Nach dem Abkühlen des Gemisches wird auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ und Eindampfen des Extraktes erhält man die Verbindung (A17), welche noch an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester (1:1) chromatographiert wird.



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,60(s, CH₃); 3,33 (s, OCH₃); 5,47 (AB, CH₂); 5,93 [d, H-C(1')]; 7,65 [s, H-C(6)]. MS: 840 (M⁺).

Beispiel A18:

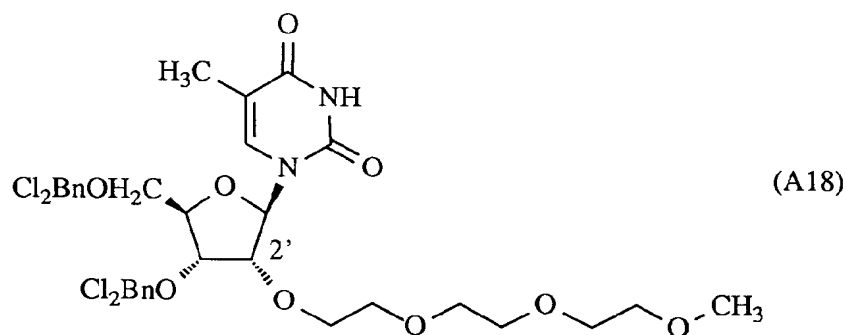
3,2 g des in Beispiel A17 hergestellten Produktes wird in 35 ml Tetrahydrofuran über 0,6 g Pd/C (5%) bei Normaldruck und 22°C hydriert. Nach 1 Stunde (H₂-Aufnahme: 96%) wird das Hydriergemisch klarfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol gelöst und mit 3,5 ml einer 30%igen Lösung von NaOCH₃ in Methanol versetzt. Nach 24 Stunden Rühren bei 20°C wird die Reaktionslösung auf Wasser gegossen und

mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 und Eindampfen des Extraktes erhält man die Verbindung (A18).

5

10

15



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 1,60 (s, CH_3); 3,55 (s, OCH_3); 5,96 [d, $J=2$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 7,62 [s, $\text{H-C}(6)$]; 8,96 (s, NH).

MS: 720/722/724 (M^+).

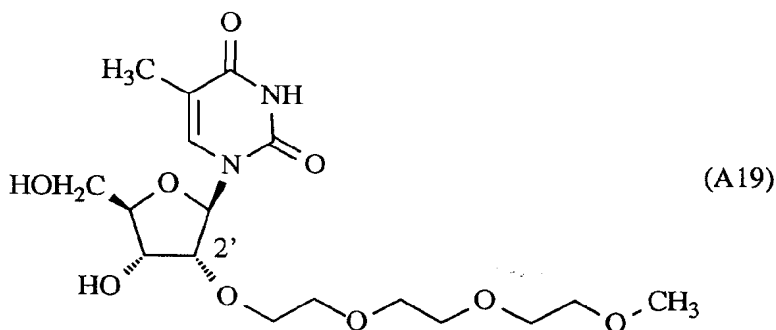
20

Beispiel A19:

2,3 g des in Beispiel A18 hergestellten Produktes werden in 75 ml Methanol gelöst und unter Zugabe von 1,15 g Natriumacetat und 1,0 g Pd/C (5%) bei 35°C hydriert. Nach 43 Stunden wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird zur Entfernung von Salzen mit Essigsäureethylester/Methanol (4:1) über Kieselgel filtriert. Man erhält die Verbindung (A19).

30

35



40

$^1\text{H-NMR}$ [250 MHz, Methanol (D_4)]: 1,72 (s, CH_3); 3,22 (s, OCH_3); 5,80 [d, $J=5\text{Hz}$, $\text{H-C}(1')$]; 7,78 [s, $\text{H-C}(6)$]. MS: 404 (M).

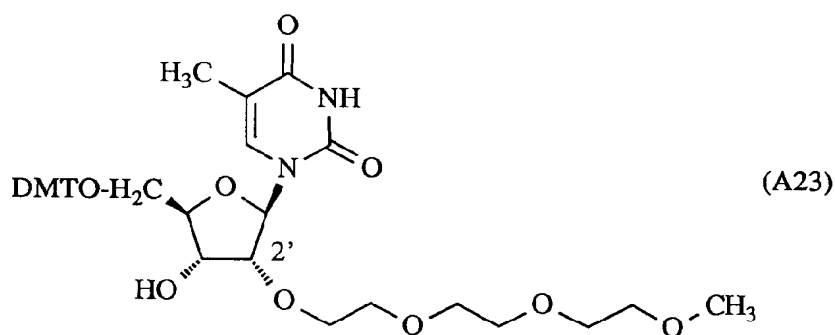
Beispiel A20:

45

400 mg des in Beispiel A19 hergestellten Produktes werden in 8 ml absolutem Pyridin gelöst. Bei 20°C gibt man 0,34 g DMTCl zu und rührt 20 Stunden lang. Dann wird mit 30 ml Methylenchlorid verdünnt und auf Wasser gegossen. Die organische Phase wird ein zweitesmal mit Wasser gewaschen und anschliessend getrocknet (MgSO_4) und eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Triethylamin (97:3) chromatographiert. Man erhält die Verbindung (A20).

50

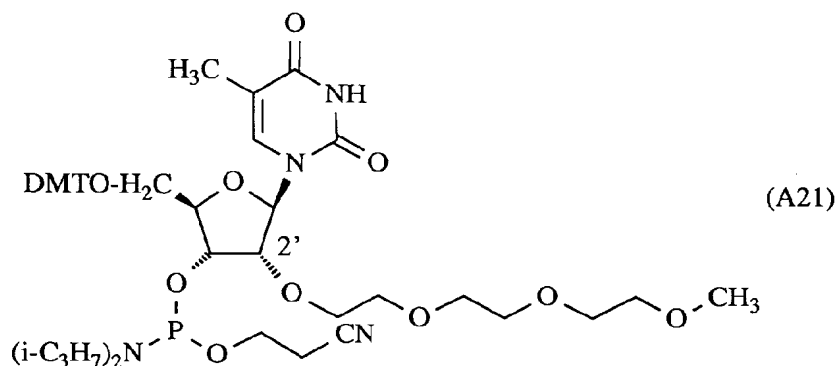
55



15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 ; alle Signale sind breit): 1,40 (s, CH_3); 3,35 (s, OCH_3); 3,70 (s, 2 x OCH_3); 6,02 (s, H-C(1')); 7,66 [s, H-C(6)].
MS: 705 (M-H).

Beispiel A21:

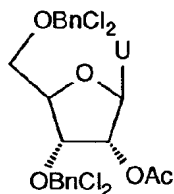
20 Zur Vorlage von 0,12 g Diisopropylammoniumtetrazolid und 0,20 g Cyanoethyltetraisopropylphosphor-
amidit in 2,5 ml absolutem Methylchlorid werden 0,39 g des in Beispiel A20 hergestellten Produktes in 2,5
ml Methylchlorid zugetropft. Nach 28 Stunden Rühren bei 20°C wird die Reaktionslösung auf eine gesättigte
wässrige NaHCO_3 -Lösung gegossen und mit Methylchlorid extrahiert. Der eingedampfte Rückstand wird an
25 Kieselgel mit Essigsäureethylester/Triethylamin (97:3) chromatographiert. Man erhält die Verbindung (A21).



40 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): Die Protonen von H-C(1') erscheinen als Doublett bei 6,02 und 6,07 ppm.
 $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3): 149,95 und 149,88 ppm

Beispiel A22:

45 21,4 g Uracil werden in 250 ml Dichlorethan suspendiert. Nach Zugabe von 116 g BSA wird auf 80° er-
wärmt. Nach 30 Minuten tritt Lösung ein. Man kühlt auf 40°C ab und gibt 50,0 g des in Beispiel A3 hergestellten
Produktes, gelöst in 350 ml Dichlorethan, sowie 27,4 g SnCl_4 zu. Anschliessend wird die Lösung 5 Stunden
auf 80°C gehalten. Nach dem Abkühlen wird auf gesättigte NaHCO_3 -Lösung gegossen, die entstehende, 2-
phasige Suspension filtriert und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird nochmals mit
50 CH_2Cl_2 extrahiert. Die gesammelten Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rück-
stand wird in Acetonitril digeriert. Man erhält die Verbindung (A22).

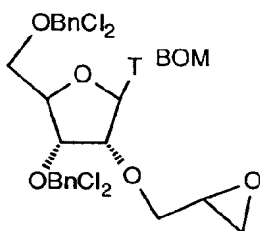


(A22)

NMR (250 MHz, CDCl_3): 2.22 (s, OAc), 5.35 (t, H-C(2')), 6,07 (d, $J=4$ Hz, H-C(1')), 5.53 und 7.23 (je d, $J=8$ Hz, H-C(5) und H-C(6)), 8.57 (s, NH).
MS: 602

Beispiel A23:

Zur Vorlage von 60 ml THF und 1,47 g NaH (100 %) werden bei 60°C 35,6 g des in Beispiel A4 hergestellten Produktes, in 300 ml THF gelöst, gegeben und 1 Stunde weiter erwärmt. Dann werden 14,0 g R-(-)Glycidyl-tosylat portionenweise eingetragen. Nach 2,5 Stunden werden erneut 0,1 g NaH zugegeben. Nach 4 Stunden Erwärmen wird abgekühlt, auf Eis gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester 9:1). Man erhält Verbindung (A23).

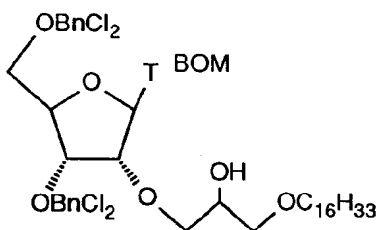


(A23)

NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.59 (s, CH_3), 5.48 (AB, CH_2), 5.92 (s, 1,5 Hz, H-C(1')), 7.62 (s, H-C(6)).
FAB-MS: 751 (M+H)

Beispiel A24:

5,1 g des in Beispiel A23 hergestellten Produktes und 4,93 g 1-Hexadecanol werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst. Dazu werden 0,96 g Bortrifluoriddiethyletherat ($d = 1,13$ g/ml) zugegeben. Diese Lösung wird 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann auf H_2O gegossen und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird über Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Hexan 1:1). Man erhält die Verbindung (A24).



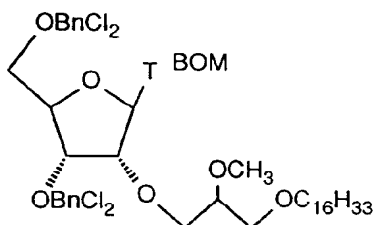
(A24)

NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.60 (s, CH_3), 5.47 (AB, CH_2), 5.93 (d, $J=1,5$ Hz, H-C(1')), 7,63 (s, H-C(6)).
FAB-MS: 1027 (M+Cl)⁻

Beispiel A25:

3,45 g des in Beispiel A24 hergestellten Produktes werden in 35 ml THF mit 0,15 g NaH (100 %) 45 Minuten auf 60°C erwärmt. Dann werden 0,63 g MeI zugegeben und 1,5 Stunden weiter erwärmt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Rückstand wird in Toluol über eine kurze Kieselgel-Säule filtriert. Man erhält die Verbindung (A25).

5



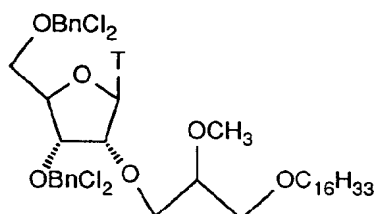
(A25)

10 NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.59 (s, CH_3), 5.45 (AB, CH_2), 5.93 (d, $J=1,5$ Hz, H-C(1')), 7.63 (s, H-C(6)).
MS (DCI): 1024 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

Beispiel A26:

15 3,3 g des in Beispiel A25 hergestellten Produktes werden in 70 ml THF über 0,7 g Pd/C hydriert (33 Stunden, H_2 -Aufnahme 104 %). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml THF und 10 ml Methanol gelöst und mit $\text{NaOCH}_3/\text{HOCH}_3$ -Lösung (30 %) versetzt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird ca. bis zur Hälfte des Volumens eingengt, dann auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird über Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Toluol 1:2). Man erhält die Verbindung (A26).

25



(A26)

30

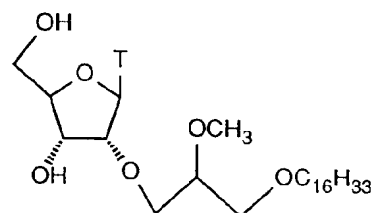
NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.62 (s, CH_3), 3.40 (s, OCH_3), 5.98 (d, $J=2$ Hz, H-C(1')), 7.62 (s, H-C(6)), 8.57 (s, NH).
MS (DCI): 886

35 Beispiel A27:

1,21 g des in Beispiel A26 hergestellten Produktes werden mit 50 ml Methanol und 5 ml Toluol über 0,2 g Pd/C (10%) und 0,258 g MgO hydriert (2 Stunden, H_2 -Aufnahme 220 ml). Das Reaktionsgemisch wird filtriert, eingedampft und über Kieselgel filtriert (Entfernung von Mg-Salzen). Man erhält die Verbindung (A27).

40

45



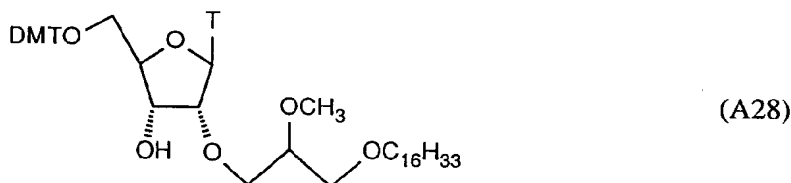
(A27)

50 NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1.72 (s, CH_3), 5.05 (d, OH), 5.18 (t, OH), 5.84 (d, $J=6$ Hz, H-C(1')), 7.77 (s, H-C(6)).
FAB-MS: 569 (M-H).

55 Beispiel A28:

0,83 g des in Beispiel A28 hergestellten Produktes werden in 50 ml Pyridin gelöst und eingedampft. Der Rückstand wird mit 8 ml Pyridin und 0,6 g DMT-Chlorid versetzt und 44 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf H_2O gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Rückstand wird

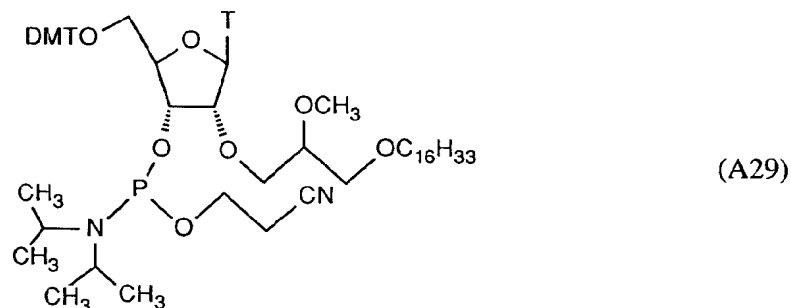
über Kieselgel chromatographiert (Toluol/Essigsäureethylester 1:1 + 1 % NEt₃-Zusatz). Man erhält die Verbindung (A28).



NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.35 (s, CH₃), 3.47 (s, OCH₃), 3.80 (s, OCH₃), 6.03(d, J=4 Hz, H-C(1')), 7.64 (s, H-C(6)), 8.20 (s, NH).
FAB-MS: 873 (M+H).

15 Beispiel A29:

0,95 g des in Beispiel A28 hergestellten Produktes werden mit 10 ml CH₂Cl₂, 0,245 g Diisopropylammoniumtetrazolid und 0,39 g Cyanethyltetraisopropylphosphordiamidit versetzt. Nach 3 Tagen Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch auf gesättigte NaHCO₃-Lösung gegossen und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Der eingedampfte Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Toluol/Essigsäureethylester 2:1 + 1 % NEt₃-Zusatz). Man erhält die Verbindung (A29).



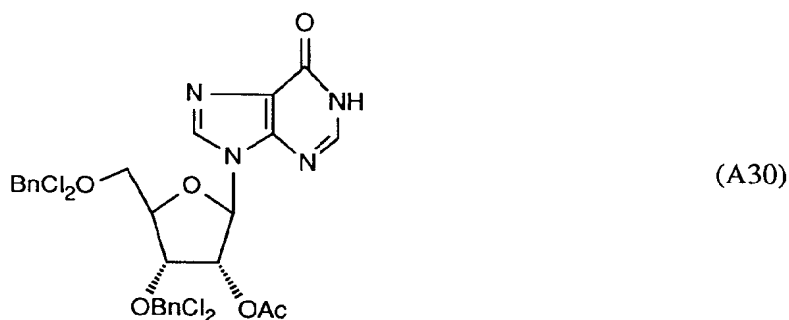
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 5.97 und 6.05 (je d, J=4 Hz, je H-C(1')), 7.62 und 7.70 (je s, je H-C(6)).
P-NMR (250 MHz, CDCl₃): 150,012 und 150,102.
FAB-MS: 1071 (M-H).

40 Beispiel A30:

15,6 g Hypoxanthin und 46,6 g BSA werden in 300 ml Dichlorethan unter Rückfluss erhitzt. Nach 30 Minuten tritt Lösung ein. Es werden 30,0 g des in Beispiel A3 hergestellten Produktes sowie 16,5 g TMS-Triflat zugegeben und weitere 16 Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch auf gesättigte NaHCO₃-Lösung gegossen und die entstehende Suspension filtriert. Das Filtrat wird mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird chromatographiert (Methanol/Essigsäureethylester 1:1). Man erhält die Verbindung (A30).

5

10



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 6.22 (d, 3 Hz, H-C(1')), 8.14 und 8.37 (je s, H-C(2) und H-C(8)).
FAB-MS: 625 M-H

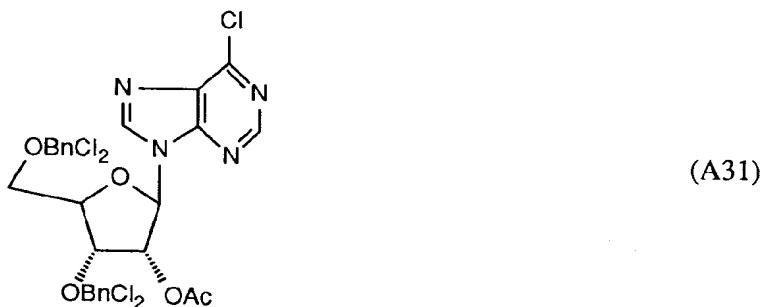
Beispiel A31:

3,8 g des in Beispiel A30 hergestellten Produktes werden in 150 ml CH₂Cl₂ vorgelegt. Unter Kochen wird dazu ein Gemisch aus 4,8 ml SOCl₂ und 2,4 ml DMF getropft. Nach 3 Stunden Weiterkochen werden erneut 1,2 ml SOCl₂ und 0,6 ml DMF zugegeben. Nach insgesamt 5,5 Stunden Kochen wird das Reaktionsgemisch auf eine gesättigte NaHCO₃-Lösung eingetragen. Nach 20 Minuten Rühren wird mit CH₂Cl₂ extrahiert. Der Extrakt wird über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A31).

25

30

35



NMR (250 MHz, CDCl₃): 5.83 (dd, H-C(2')), 6.33 (d, J=3 Hz, H-C(1')), 8.47 und 8.73 (je s, H-C(2) und H-C(8)).
MS: 664

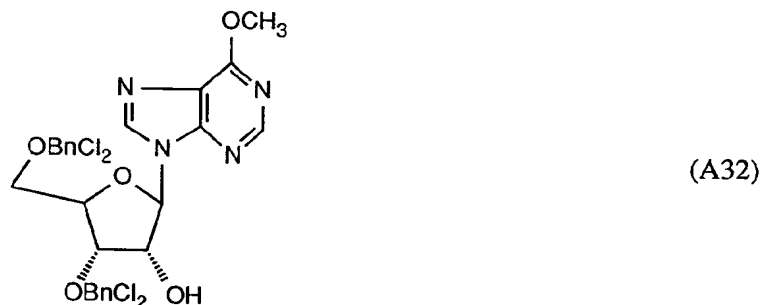
40

Beispiel A32:

30,4 g des in Beispiel A31 hergestellten Produktes werden in 200 ml Methanol und 100 ml THF gelöst. Dazu werden 16,9 g 30%-ige NaOMe/Methanol getropft. Nach 3 Stunden Rühren wird auf H₂O gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A32).

50

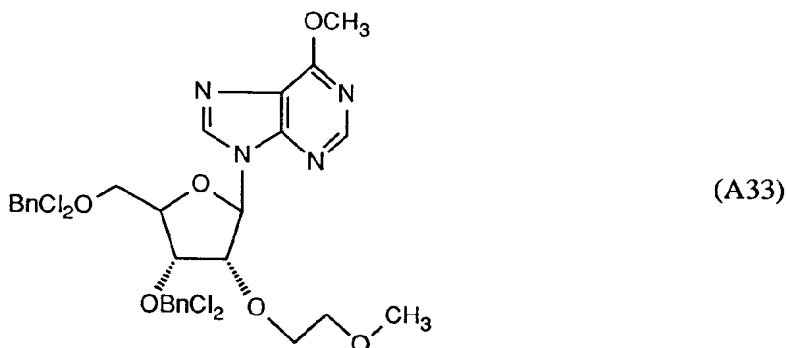
55



NMR (250 MHz, CDCl_3): 4.20 (s, OCH_3), 6.10 (d, $J=6$ Hz, H-C(1')), 8.17 und 8.48 (je s, H-C(2) und H-C(8)).
MS: 598

Beispiel A33:

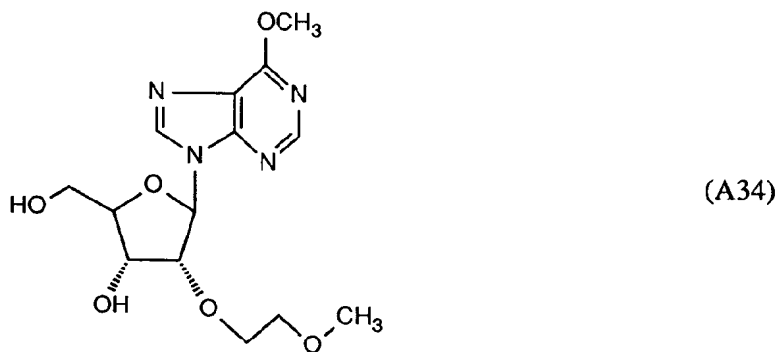
Zu 25,4 g des in Beispiel A32 hergestellten Produktes in 250 ml THF werden 1,17 g NaH (100 %) gegeben. Unter Kochen werden 6,76 g 2-Bromethylmethylether zugetropft. Nach 6 Stunden Weiterkochen werden erneut 0,5 g NaH und 1,9 ml Bromid zugegeben. Nach 23 Stunden wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und auf H_2O gegossen. Nach Extraktionen mit Essigsäureethylester wird eingedampft und der Rückstand chromatographiert. (Kieselgel, Hexan/Aceton 2:1). Man erhält die Verbindung (A33).



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 3.27 (OCH_3), 4.20 (OCH_3), 6.27 (d, $J=5$ Hz, H-C(1')), 8.24 und 8.52 (je s, H-C(2) und H-C(8)).
MS(DCI): 656

Beispiel A34:

2,2 g des in Beispiel A33 hergestellten Produktes wird in 45 ml Methanol mit 0,66 g Pd/C (10 %) und mit Zusatz von 402 ml MgO hydriert. Nach 13 Stunden (H_2 -Aufnahme: 485,5 ml H_2) wird das Gemisch klarfiltriert und eingedampft. Zur Entfernung von Magnesiumsalzen wird über Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol 9:1). Man erhält die Verbindung (A34).



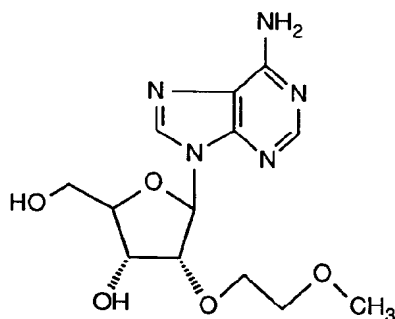
NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 4.4 (t, OH), 5.23 (OH), 5.94 (d, $J=6,5$ Hz, H-C(1')), 8.40 und 8.55 (je s, H-C(2) und H-C(8)).
FAB MS: 339 (M-H) $^-$.

Beispiel A35:

2,46 g des in Beispiel A34 hergestellten Produktes werden in 80 ml Methanol gelöst und in einen Autoklaven verbracht. Es werden 20 g NH_3 aufgespresst und die Apparatur 12 Stunden auf 120°C gehalten (Innendruck: 17 bar). Das Reaktionsgemisch wird eingedampft und an Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol). Man erhält die Verbindung (A35).

5

10



(A35)

NMR (250 MHz, DMSO- D_6): 5.32 (d, OH), 5.60 (t, OH), 6.15 (d, $J=6$ Hz, H-C(1')), 8.33 und 8.57 (je s, H-C(2) und H-C(8)).

MS (DCI): 326 (M+H).

15

Beispiel A36:

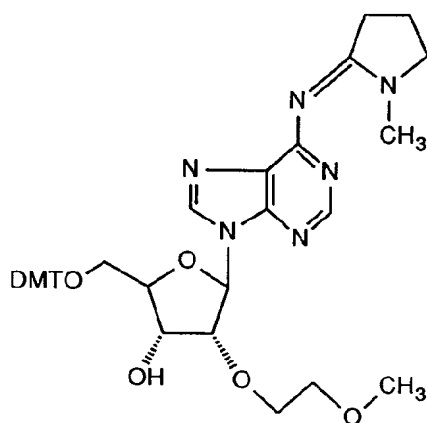
0,48 g des in Beispiel A35 erhaltenen Produktes werden in 5 ml Methanol gelöst und mit 0,28 g N-Methyl-2,2-dimethoxypyrrolidin versetzt. Nach 18-stündigem Rühren wird eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit Pyridin versetzt und eingedampft. Der verbliebene Rückstand wird in 10 ml Pyridin gelöst und mit 0,5 g DMT-chlorid 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird auf H_2O gegossen und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird über Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol 9:1). Man erhält die Verbindung (A36).

25

30

35

40



(A36)

NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 3.09 (s, NMe), 3.72 (s, OCH_3), 6.08 (d, $J=6$ Hz, H-C(1')), 7.98 und 8.43 (je s, H-C(2) und H-C(8)).

FAB MS: 709 (M+H)

45

Beispiel A37:

Zu 0,38 g Cyanethyltetraisopropylphosphordiamidit und 0,24 g Diisopropylammoniumtetrazolid in 6 ml CH_2Cl_2 werden 0,63 g des in Beispiel A36 erhaltenen Tritylderivates in 6 ml CH_2Cl_2 gegeben. Nach 40-stündigem Rühren wird das Reaktionsgemisch auf gesättigte $NaHCl_3$ -Lösung gegossen und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird chromatographiert (Essigsäureethylester + 1 % NEt_3). Man erhält die Verbindung (A37).

50

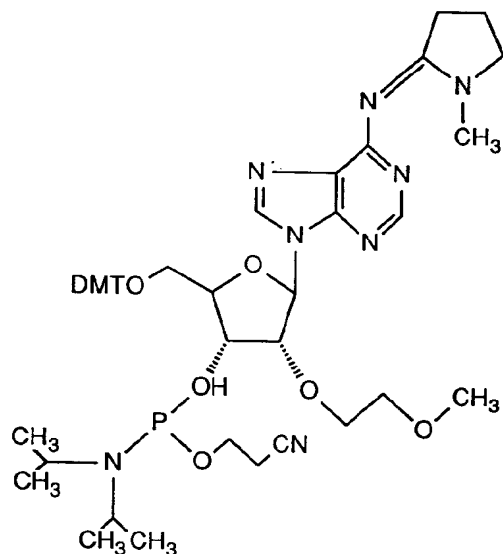
55

5

10

15

20



(A37)

^{31}P -NMR (250 MHz, CDCl_3): 149.8 und 150.4.
FAB-MS: 909 ($\text{M}+\text{H}$)

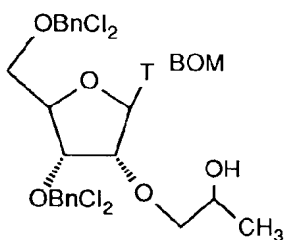
Beispiel A38:

25

7,1 g des in Beispiel A23 hergestellten Epoxids wird in 70 ml THF gelöst, mit 0,43 g NaBH_4 versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Dazu werden 0,5 g $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ zugegeben. Nach insgesamt 26 Stunden wird auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Eindampfen erhält man die Verbindung (A38).

30

35



(A38)

40

NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.16 (d, $J=7,5$ Hz, CH_3), 1.61 (s, CH_3), 5.48 (AB, CH_2), 5.92 (d, $J=1$ Hz, $\text{H-C}(1')$), 7.69 (s, $\text{H-C}(6)$).
FAB-MS: 787 ($\text{M}+\text{Cl}$)⁻.

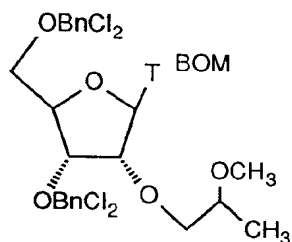
Beispiel A39:

45

6,9 g des in Beispiel A38 erhaltenen Alkohols werden mit 1,56 g NaH (100 %) und 1,56 g MeJ in 70 ml THF methyliert (60°C, 5 Stunden). Nach dem üblichen Aufarbeiten erhält man die Verbindung (A39).

50

55

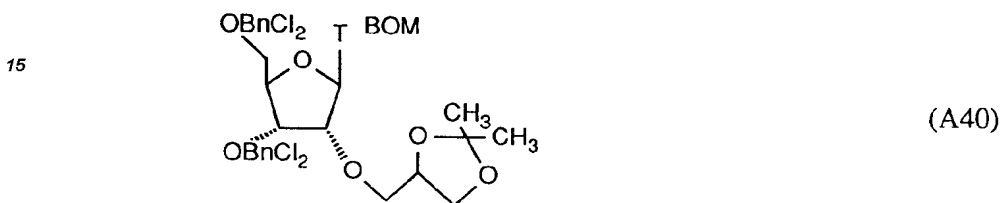


(A39)

NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.13 (d, $J=7,5$ Hz, CH_3), 1.60 (s, CH_3), 3.33 (s, OCH_3), 5.49 (AB, CH_2), 5.95 (A, $J=2$ Hz, H-C(1')), 7.64 (s, H-C(6)).
MS (DCI): 766 (M^-).

5 Beispiel A40:

14,4 g des nach Beispiel A4 hergestellten Derivates werden in 150 ml THF und 0,65 g NaH (100 %) 30 Minuten auf 60°C erwärmt. Dann wird auf 25°C abgekühlt und es werden 5,92 g D- α,β -Isopropylidenglycerin- γ -tosylat zugegeben. Nach 1,5 Stunden wird noch 3 Stunden bei 60°C weitergerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wird auf Wasser gegossen, mit Essigsäureethylester extrahiert und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester 4:1) chromatographiert. Man erhält die Verbindung (A40).



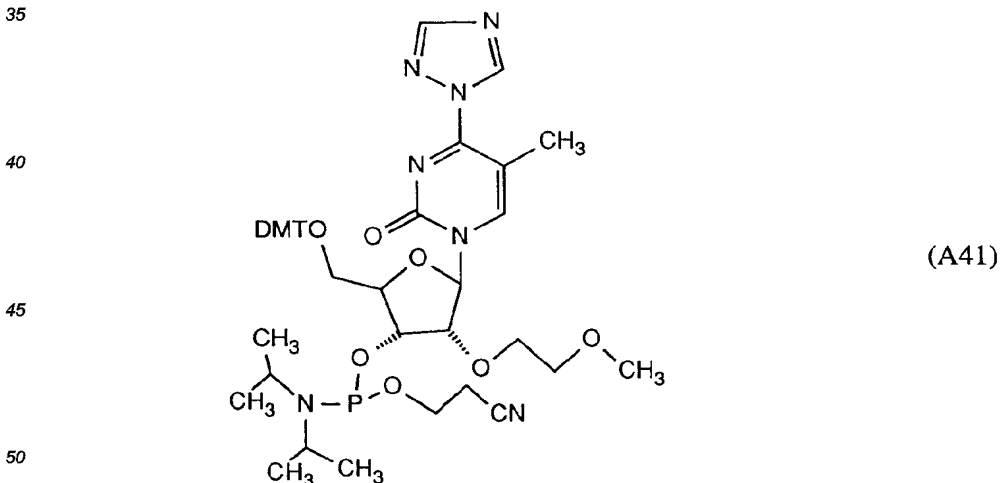
NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.34 und 1.41 (je s, je CH_3), 1.58 (s, CH_3), 5.48 (AB, CH_2), 5.92 (d, $J=1,5$ Hz, H-C(1')), 7.68 (s, H-C(6)).
MS (DCI): 843 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$.

25

Beispiel A41:

3,13 g des nach Beispiel A13 hergestellten Phosphoramidites werden in 50 ml Acetonitril gelöst. Dazu werden 9,4 ml NEt_3 und 6,17 g 1,2,4-Triazol gegeben. Unter Rühren werden anschliessend 1,53 g POCl_3 derart zugetropft, dass 30°C nicht überschritten werden. Nach 4 Stunden Weiterführen bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch auf 1 N NaHCO_3 (150 ml) gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird in wenig CH_2Cl_2 gelöst und in 100 ml n-Pentan eingerührt. Dabei fällt die Verbindung (A41) aus.

35



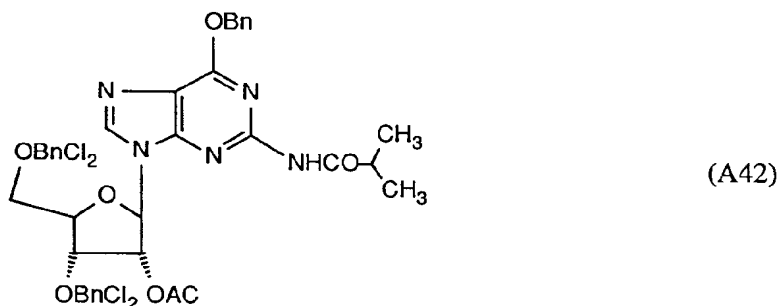
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 6.02 und 6.06 (je d, $J=1,5$ Hz, H-C(1')), 8.44 und 8.47 (je s, H-C(6)), 8.07 und 9.35 (je s, triazole H).

55 $^{31}\text{P-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 149,433 und 150,253

MS (DCI): 869 (M^-)

Beispiel A42:

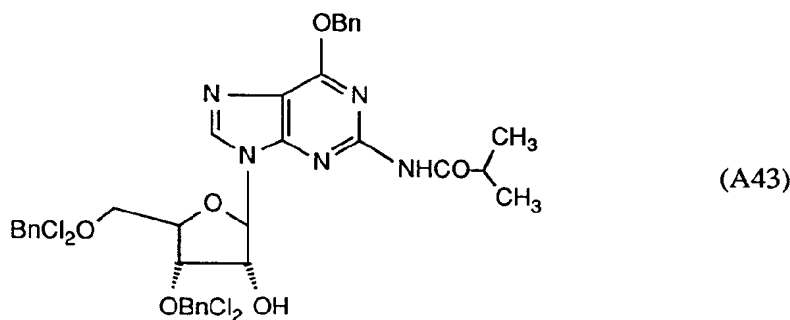
8,88 g N²-Isobutyryl-O⁶-benzylguanin [hergestellt nach analoger Vorschrift von Jenny, T.F., Schneider, K.C., Benner, S.A., Nucleosides and Nucleotides 11:1257-1261 (1992)] und 34,8 g N,O-Bis-(trimethylsilyl)acetamid werden in 130 ml Toluol suspendiert und auf 100°C erhitzt bis Lösung eintritt. Bei 50°C werden 13,0 g des nach Beispiel A3 hergestellten Ribosederivates sowie 6,33 g Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester zugegeben. Die farblose Lösung wird 4 Stunden bei 100°C gerührt und nach dem Abkühlen auf 200 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung gegossen. Nach dem Extrahieren mit Essigsäureethylester wird über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird über 1,2 kg Kieselgel chromatographiert (Toluol/Essigsäureethylester 4:1). Man erhält die Verbindung (A42).



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.26 (d, J=7,5 Hz, CH₃), 2.23 (s, OAc), 5.61 (AB, OCH₂), 5.78 (dd, H-C(2')), 6.19 (d, J=3 Hz, H-C(1')), 7.83 (s, NH), 8.00 (s, H-C(8)).
MS (DCI): 801 (M⁻).

Beispiel A43:

7,4 g des im Beispiel A42 hergestellten Derivates, in 80 ml Methanol gelöst, werden mit 0,83 g einer 30%igen NaOMe/Methanol-Lösung versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf H₂O gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird nach Trocknen über MgSO₄ eingedampft. Man erhält die Verbindung (A43).

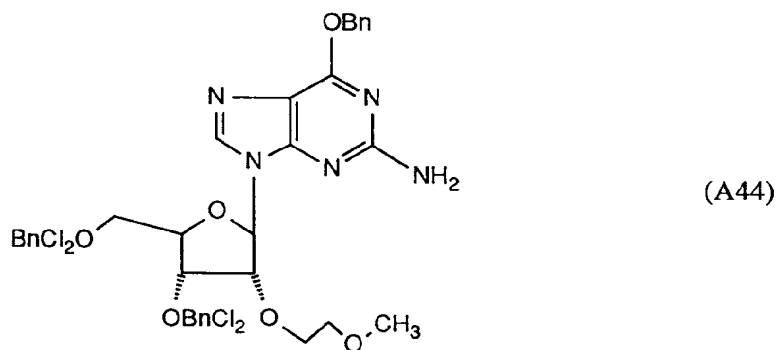


NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.29 (d, J=7,5 Hz, CH₃), 5.61 (AB, OCH₂), 5.99 (d, J=6 Hz, H-C(1')), 7.97 (s, NH), 8.04 (s, H-C(8)).
MS (DCI): 760 (M+H)⁺

Beispiel A44:

Zu 9,0 g der nach Beispiel A43 hergestellten Verbindung in 100 ml THF werden 630 mg NaH (100 %) gegeben und 15 Minuten gerührt. Dann werden 1,97 g 2-Bromethyl-methylether zugespritzt. Nach 25 Stunden werden erneut 2,0 g Bromid zugegeben. Nach total 48 Stunden Rühren wird auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird über Kieselgel chromatographiert (Toluol/Es-

sigsäureethylester 4:1). Man erhält die Verbindung (A44).



NMR (250 MHz, CDCl₃): 3.28 (s, OCH₃), 5.56 (AB, OCH₂), 6.10 (d, J=5 Hz, H-C(1')), 7.90 (s, H-C(8)).
FAB-MS: 748 (M+H)⁺.

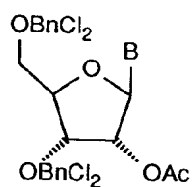
20 Beispiel A45:

Ausgehend von Verbindung (A3) werden weitere Basen eingeführt. Die Produkte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Beispiele für weitere Baseneinführungen

5

10

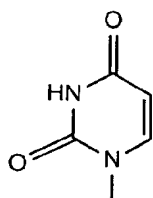


B

 δ H-C(1') im $^1\text{H-NMR}$ (in ppm)

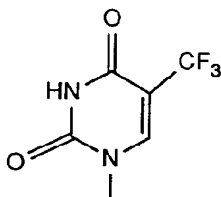
15

20



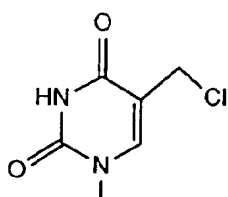
6,07 (d, J=4 Hz)

25



6,19 (d, J=4 Hz)

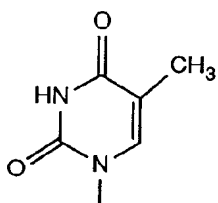
30



6,08 (d, J=5 Hz)

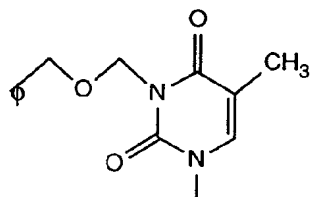
35

40



6,10 (d, J=4,5 Hz)

45

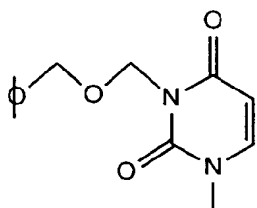


6,05 (d, J=4,5 Hz)

50

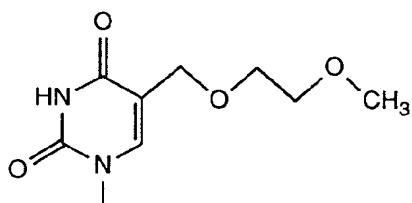
55

5



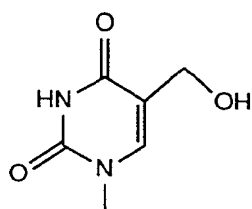
6,02 (d, J=3 Hz)

10



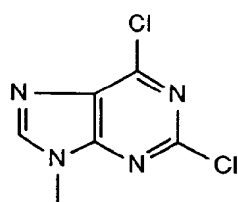
5,95 (d, J=4 Hz)

15



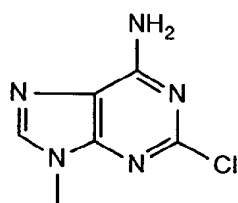
6,12 (d, J=5 Hz)

20



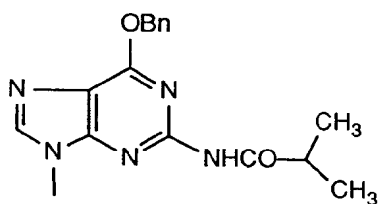
6,27 (d, J=6 Hz)

25



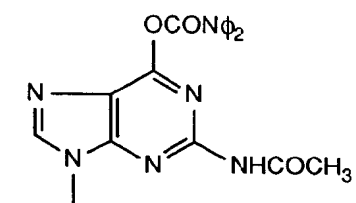
6,18 (d, J=4 Hz)

35



6,19 (d, J=3 Hz)

40

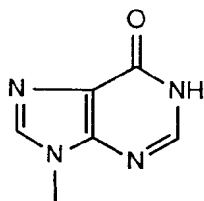


6,14 (d, J=4 Hz)

50

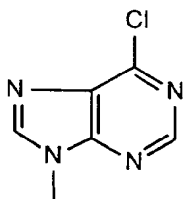
55

5



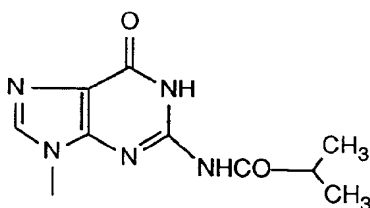
6,22 (d, J=3 Hz)

10



6,32 (d, J=4 Hz)

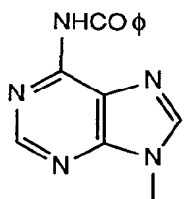
15



6,06 (d, J=5 Hz)

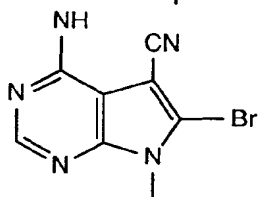
20

25



6,33 (d, J=4 Hz)

30



6,12 (d, J=4 Hz)

35

Beispiel B: Herstellung von Oligonukleotiden

40

Oligonukleotide werden unter Verwendung der erfindungsgemässen dimethoxytritylierten und 3'-aktivierten [3'-(β-Cyanoethoxy-di(i-propylamino)phosphoramidit)] Nukleoside bzw. solchen natürlichen aktivierten Nukleosiden an einen festen Träger gebunden (Controlled Pore Glas, CPG) und die Synthese auf einem DNA-Synthesiser (Applied Biosystems, Modell 380 B, Standard Phosphoramiditchemie und Iodoxidation) gemäss den Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt [vergleiche auch "Oligonucleotide synthesis a practical approach" M.J Gait; IRL Press 1984 (Oxford-Washington DC)]. Nach der Kopplung des letzten Nukleosidbausteins wird das 5'-geschützte Oligonukleotid unter gleichzeitiger Abspaltung aller übrigen Schutzgruppen durch Behandlung mit konzentriertem wässrigem Ammoniak über Nacht vom Träger abgelöst und anschliessend unter Verwendung von 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7)/Acetonitril durch "reverse-phase" HPLC gereinigt. Anschliessend wird die 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe durch 20-minütige Behandlung mit 80 %-iger wässriger Essigsäure abgespalten, das Oligonukleotid mit Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation isoliert. Die Reinheit des Oligonukleotids wird durch Gelelektrophorese (Polyacrylamid), seine Identität mittels matrixunterstützter Laserdesorptions-Time-of-flight Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS) überprüft.

55

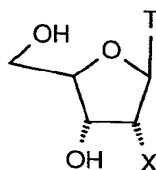
Beispiel C1: Affinität; Wechselwirkung der Oligonukleotide (Antisense) mit komplementären Oligoribonukleotidsequenzen (Sense)

Die Wechselwirkung der Oligonukleotide mit den entsprechenden basenkomplementären Oligomeren der natürlichen Ribonukleotide wird durch das Aufzeichnen von UV-Schmelzkurven und den daraus ermittelten T_m -Werten charakterisiert. Diese Standardmethode ist zum Beispiel von Marky, L.A., Breslauer, K.J., Biopolymers 26:1601-1620 (1987) beschrieben.

Es wird eine Lösung der Oligonukleotide und der entsprechenden basenkomplementären natürlichen Oligoribonukleotide in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH = 7,0 ($c = 4 \cdot 10^{-6}$ M/Oligonukleotid) hergestellt und die Änderung der Extinktion bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (15 bis 95°C) aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Schmelzkurven wird der T_m -Wert ermittelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Affinität

(a) TTTTtCTCTCTCTCT (vs. RNA)

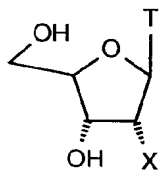


X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$
H	51,8	0
	53,0	+ 1,2
	52,7	+ 0,9
	52,9	+ 1,1
	52,2	+ 0,4
	53,3	+ 1,5
	53,3	+ 1,5

(b) CTCGTACCTTCCGTCC (vs. RNA)

5

10



15

X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
H	63,3	0
	64,9	+ 1,6
	64,0	+ 0,7
	64,1	+ 0,8

20

25

30

35

40

45

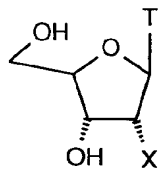
50

55

(c) CTCGTACttttCCGGTCC (vs RNA)

5

10



15

X

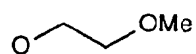
 $T_m(^{\circ}\text{C})$ $\Delta T_m(^{\circ}\text{C})/\text{mod.}$

20

H

61,8

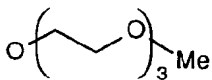
0



65,4

+ 0,9

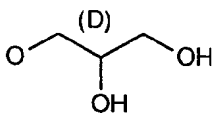
25



65,0

+ 0,8

30



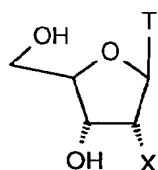
65,4

+ 0,9

(d) tCCAGGtGtCCGCAtC (vs. RNA)

35

40



45

X

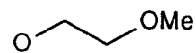
 $T_m(^{\circ}\text{C})$ $\Delta T_m(^{\circ}\text{C})/\text{mod.}$

50

H

66,5

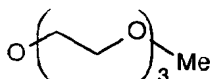
0



70,1

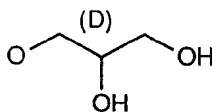
+ 0,9

55



71,3

+ 1,2



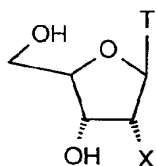
71,3

+ 1,2

(e) GCGtttttttttGCG (vs. RNA)

5

10



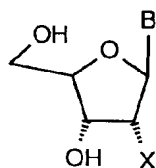
X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod.
H	50,2	0
	62,4	+ 1,2
	62,5	+ 1,2
(L)		
	62,4	+ 1,2

30

(f) tttttctctctctC

35

40



B	X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod.
T, C	H	51,8	0
T, 5 Me-C		75,8	+ 1,6

50

Beispiel D2: Spezifität; Wechselwirkung des Oligonukleotids mit basenkomplementären Oligoribonukleotiden, in welche ein falsches Nukleosid (Y) eingebaut wurde

55

Man stellt Lösungen des Oligonukleotids mit den entsprechenden basenkomplementären Oligonukleotiden der Sequenzen r(GGA CCG GAA YGG TAC GAG) in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7, ($c = 4 \cdot 10^{-6}$ M/Oligonukleotid) her und misst die Änderung der Extinktion bei 260 nm in

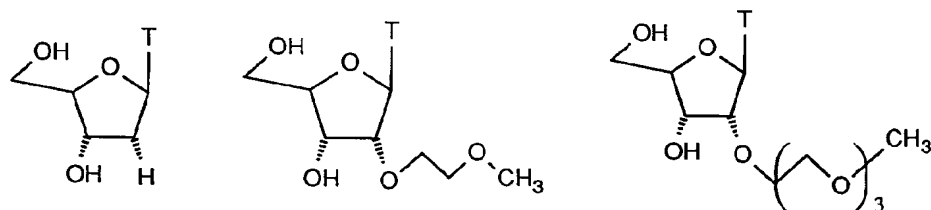
Abhängigkeit von der Temperatur (15°C bis 95°C). Aus den Kurven wird der T_m -Wert ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Spezifität

sense: GAG CAU GGY AAG GCC AGG (RNA)

anti: CTC GTA CCT TTC CGG TCC (DNA)

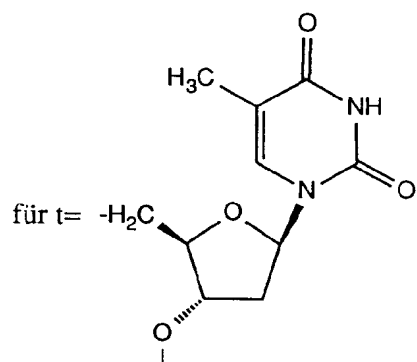
$T_m(^{\circ}\text{C})$ resp. ΔT_m



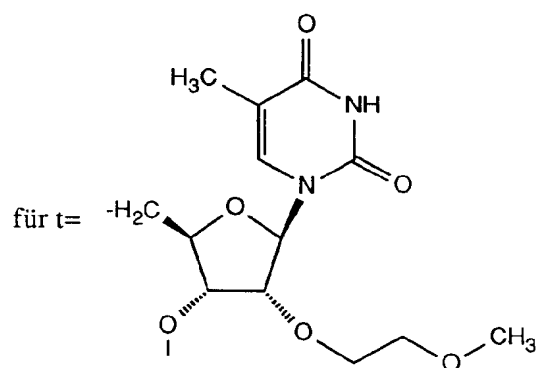
Y=A	63,3	65,0	64,1
Y=C	54,5	55,8	55,1
	(- 8,9)	(- 9,2)	(- 9,0)
Y=G	61,6	61,4	59,5
	(- 1,7	(- 3,6)	(- 4,5)
Y=U	55,8	57,5	55,9
	(- 7,5)	(- 7,5)	(- 8,2)
Y=none	59,4	57,8	56,4
	(- 3,9)	(- 7,2)	(- 7,7)

Beispiel C3: Nucleasestabilität; Enzymatische Hydrolyse verschiedener Oligonukleotide der Sequenz d(TCC AGG TGT CCG ttt C)

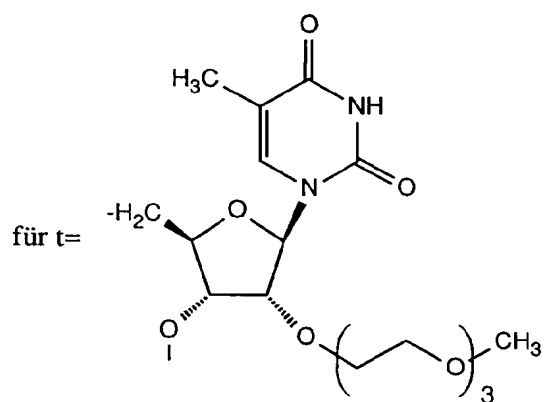
Je 14 μg des synthetischen Oligonukleotids beziehungsweise des entsprechenden natürlichen Oligomers werden in 200 μl 10%-igem Hitze-inaktivierten Serum aus Kalbsföten bei 37°C inkubiert ($c = 70 \mu\text{g/ml}$). Nach 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 und 48 Stunden werden jeweils 15 μl der Reaktionslösung durch Zugabe zu 25 μl 9 M Harnstoff und Trisborat-Puffer (pH 7) gequencht und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die gequenchten Reaktionslösungen werden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Spaltprodukte über den Phosphorgehalt bestimmt (Phospho-imagers-Methode). Das Verhältnis R der Summe der Konzentrationen des völlig intakten Oligonukleotids ($c_n^{(t)}$) und des durch Abspaltung des natürlichen C-Bausteins vom 3'-Ende entstehenden Fragments ($c_{n-1}^{(t)}$) zu einer gegebenen Zeit t zur Ausgangskonzentration des völlig intakten Oligonukleotids zum Zeitpunkt t = 0 ($c_n^{(0)}$) $R = (c_n^{(t)} + c_{n-1}^{(t)})/c_n^{(0)}$ wird gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Die dabei ermittelten Halbwertszeiten $\tau_{1/2}$ - das sind jene Zeiten, für die $R=0,5$ - betragen



$\tau_{1/2} = 2 \text{ h,}$



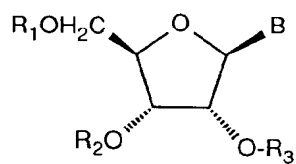
$\tau_{1/2} = 48 \text{ h}$



$\tau_{1/2} > 96 \text{ h.}$

Patentansprüche

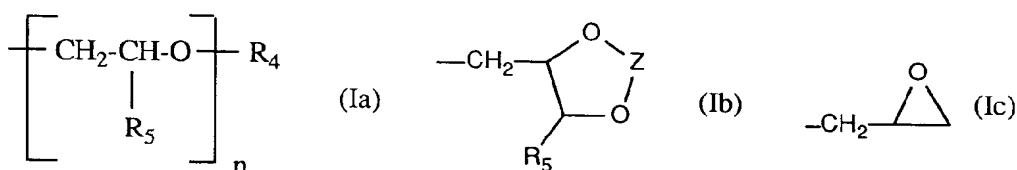
1. Verbindungen der Formel I



(I)

worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R₁ diese

Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und R_3 einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet



worin

R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl, C_2 - C_{21} -Alkynyl oder $-C(=O)$ -Alkyl;

R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-CH_2-O-R_6$ oder einen Rest der Formel Ib;

R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-[(CH_2)_2-O]_m-R_7$;

R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl;

Z $-(CH_2)_p-$ oder $-(CH_2-CH-O)_q-CH_2CH_2-$, wobei Z im Fall von $-CH_2-$ unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C_1 - C_{10} -Alkyl, C_5 - C_6 -Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C_1 - C_4 -Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann;

n eine Zahl von 1 bis 12;

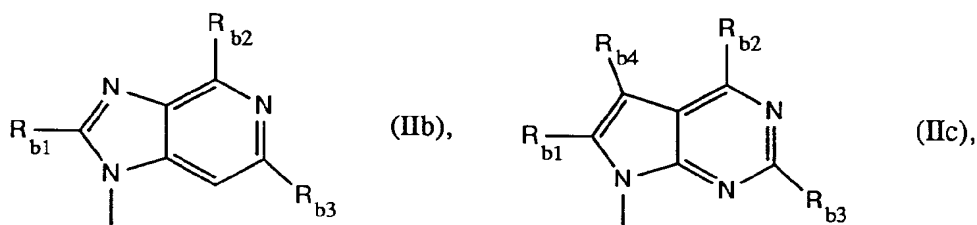
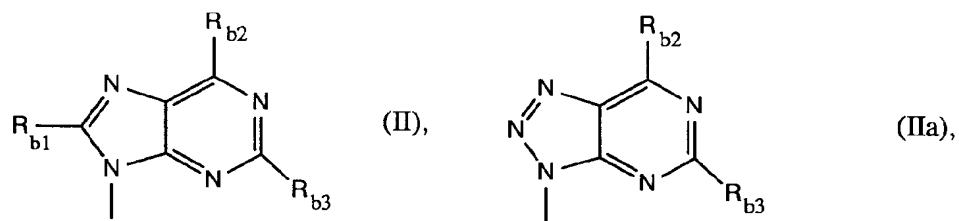
m eine Zahl von 1 bis 4;

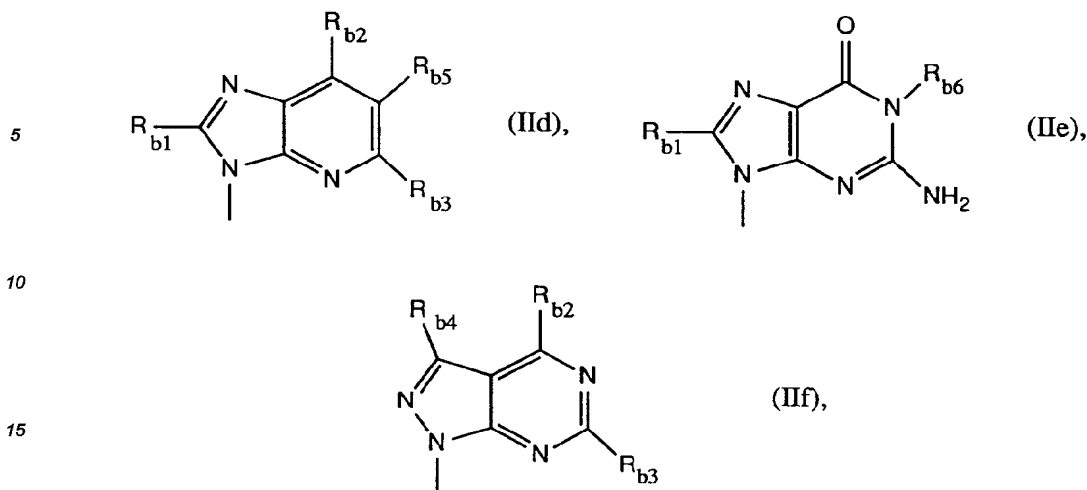
p eine Zahl von 1 bis 10; und

q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten;

wobei R_4 für den Fall $n=1$ und R_5 =Wasserstoff nicht Wasserstoff bedeutet.

2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 und R_2 je für Wasserstoff stehen.
3. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 und R_2 gleiche Schutzgruppen bedeuten.
4. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Purinrest oder einem Analogem davon einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf darstellt,

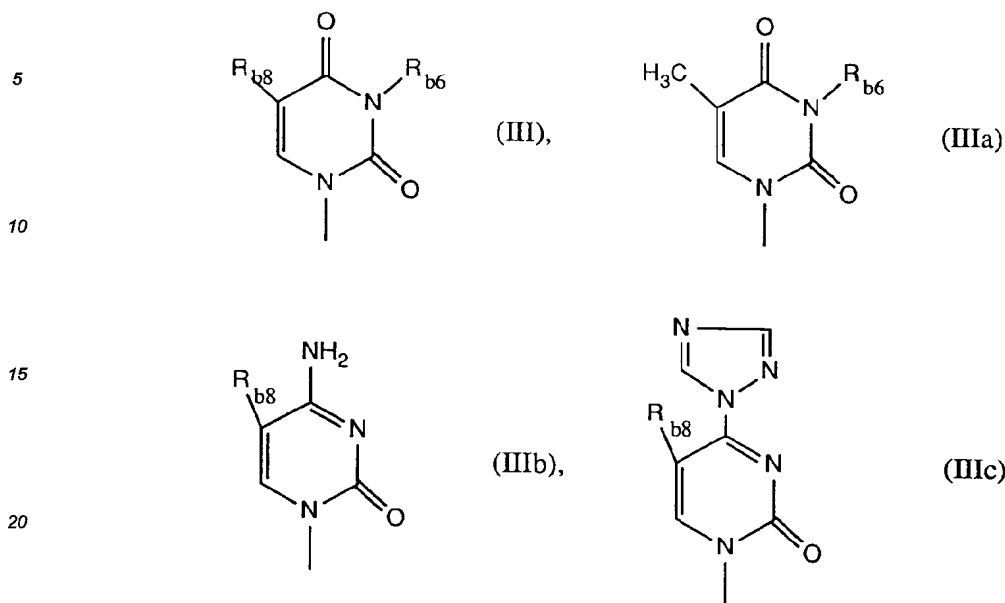




20 worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und R_{b2} , R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br, C_1-C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1-C_{12} -alkyl, Amino- C_1-C_{12} -alkyl, C_1-C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1-C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder $-C\equiv C-R_{b7}$ sowie R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C_1-C_4 -Alkyl darstellen.

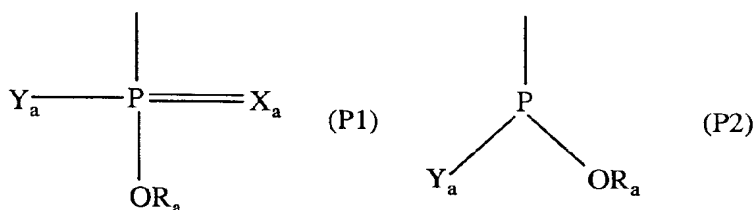
- 25 5. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin die Schutzgruppe für Hydroxyl- und Aminogruppen C_1-C_8 -Acyl darstellt.
- 30 6. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin das Primäramino 1 bis 12 C-Atome und das Sekundäramino 2 bis 12 C-Atome enthält.
- 35 7. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Reste der Formel $R_{a1}R_{a2}N$ handelt, worin R_{a1} für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_{a2} hat, und R_{a2} C_1-C_{20} -Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C_2-C_{20} -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- C_1-C_6 -Alkyl darstellt, oder R_{a1} und R_{a2} zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentilen, $-CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ oder $-CH_2CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ darstellen, worin R_{a3} für H oder C_1-C_4 -Alkyl steht, wobei die Aminogruppe im Aminoalkyl unsubstituiert oder mit ein oder zwei C_1-C_4 -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert ist, und die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl gegebenenfalls mit C_1-C_4 -Alkyl verethert ist.
- 40 8. Verbindungen gemäss Anspruch 6, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(hydroxyeth-2-yl)-, Phenyl- und Benzyl-, Acetyl-, Isobutyryl und Benzoylamino handelt.
- 45 9. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b1} in den Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId und Ile für Wasserstoff steht.
10. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b5} in Formel IId für Wasserstoff steht.
- 50 11. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b2} und R_{b3} in den Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId und If unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH, NH_2 , $NHOH$, $NHNH_2$, Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio darstellen.
- 55 12. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin B ein Purinrest oder ein Rest eines Purinanalogen aus der Reihe Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin und N-Isobutyrylguanin ist.
13. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B in Formel I als Pyrimidinrest einen Uracil-, Thymin- oder

Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,



worin R_{b6} H oder C_1 - C_4 -Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, NHO - C_1 - C_{12} -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br, C_1 - C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1 - C_{12} -alkyl, Amino- C_1 - C_{12} -alkyl, C_1 - C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1 - C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C_1 - C_{12} -Alkenyl oder C_1 - C_{12} -Alkynyl bedeuten, und die NH_2 -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

14. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R_{b8} H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino darstellt.
15. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R_{b8} H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 Alkenyl oder Alkynyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino darstellt.
16. Verbindungen gemäss Anspruch 14, worin R_{b8} H, F, Cl, Br, NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, C_1 - C_4 -Alkyl, C_2 - C_4 -Alkenyl-(1) oder C_2 - C_4 -Alkynyl-(1) bedeutet.
17. Verbindungen gemäss Anspruch 15, worin R_{b8} H, C_1 - C_4 -Alkyl, C_2 - C_4 -Alkenyl-(1), C_2 - C_4 -Alkynyl-(1), NH_2 , $NHCH_3$ oder $(CH_3)_2N$ bedeutet.
18. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Rest eines Pyrimidinanalogen sich von Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincytosin ableitet.
19. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_2 als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2



entspricht, worin Y_a Wasserstoff, C_1 - C_{12} -Alkyl, C_6 - C_{12} -Aryl, C_7 - C_{20} -Aralkyl, C_7 - C_{20} -Alkaryl, $-OR_b$, $-SR_b$, $-NH_2$, Primäramino, Sekundäramino, $O^\ominus M^\oplus$ oder $S^\ominus M^\oplus$ darstellt;

X_a Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R_a Wasserstoff, M^\oplus , C_1 - C_{12} -Alkyl, C_2 - C_{12} -Alkenyl, C_6 - C_{12} -Aryl, oder die Gruppe R_aO- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R_b Wasserstoff, C_1 - C_{12} -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl bedeutet; und M^\oplus für Na^\oplus , K^\oplus , Li^\oplus , NH_4^\oplus steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quaternärammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y_a , R_a und R_b unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, $-CN$, $-NO_2$, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

20. Verbindungen gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass R_a β -Cyanoethyl bedeutet, und Y_a Di(i-propyl)amino darstellt.

21. Verbindung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 einen Rest der Formel Ia bedeutet.

22. Verbindungen gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass n für einen Zahlenwert von 1 bis 8 steht.

23. Verbindungen gemäss Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass n für einen Zahlenwert von 1 bis 6 steht.

24. Verbindungen gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl oder C_2 - C_{21} -Alkinyl bedeutet.

25. Verbindungen gemäss Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass R_4 für Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl steht.

26. Verbindungen gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass R_5 Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl oder $-CH_2-OH$, $-CH_2-O-C_1-C_{22}$ -Alkyl oder $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_m-C_1-C_{10}$ -alkyl, worin m eine Zahl von 1 bis 4 ist, bedeutet.

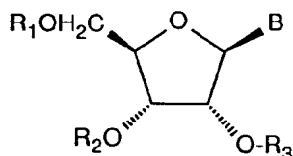
27. Verbindungen gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass R_5 Wasserstoff, Methyl oder $-CH_2-OH$, $-CH_2-O-C_1-C_{22}$ -Alkyl oder $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_m-C_1-C_{10}$ -alkyl, worin m eine Zahl von 1 bis 4 ist, bedeutet.

28. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 einen Rest der Formel Ib bedeutet.

29. Verbindungen gemäss Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass Z $-CH_2-$ oder substituiertes $-CH_2-$ bedeutet.

30. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 einen Rest der Formel Ic bedeutet.

31. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,

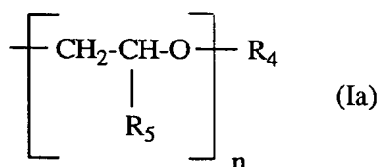


(I)

worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R_1 diese Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und

(a) R_3 einen Rest der Formel Ia bedeutet

5



10

worin R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl, C_2 - C_{21} -Alkynyl oder $-\text{C}(=\text{O})$ -Alkyl; R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-\text{CH}_2\text{-O-R}_6$ oder einen Rest der Formel Ib; R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-\text{[(CH}_2)_2\text{-O]}_m\text{-R}_7$; R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl; n eine Zahl von 1 bis 12; und m eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten; wobei R_4 für den Fall $n=1$ und R_5 =Wasserstoff nicht Wasserstoff ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa

15

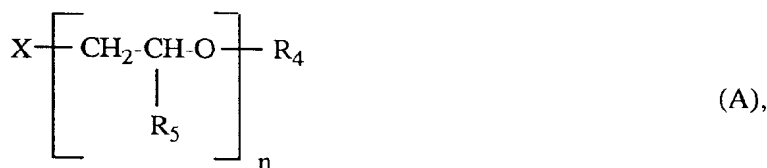


20

worin R_{14} und R_{15} für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umsetzt

25

30



35

worin R_4 , R_5 und n die oben genannten Bedeutungen haben und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;

(b) R_3 einen Rest der Formel Ic bedeutet

40



45

dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel B umsetzt

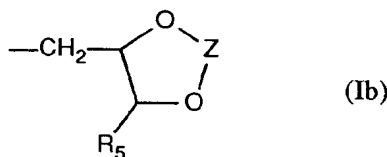
50



worin X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;

(c) R_3 einen Rest der Formel Ib bedeutet

55



worin R_5 Wasserstoff, C_1 - C_{10} -Alkyl, $-CH_2-O-R_6$ oder einen Rest der Formel Ib; R_6 Wasserstoff, C_1 - C_{22} -Alkyl, C_3 - C_{21} -Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C_1 - C_{10} -Alkyl oder $-[(CH_2)_2-O]_m-$ R_7 ; R_7 Wasserstoff oder C_1 - C_{21} -Alkyl; Z $-(CH_2)_p-$ oder $-(CH_2-CH-O)_q-CH_2CH_2-$, wobei Z im Fall von $-CH_2-$ unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C_1 - C_{10} -Alkyl, C_5 - C_6 -Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C_1 - C_4 -Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann; m eine Zahl von 1 bis 4; p eine Zahl von 1 bis 10; und q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten;

dadurch gekennzeichnet, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von H_2O und BF_3 öffnet und mit einer Verbindung der Formel $X'-(CH_2)_q-X'$ oder $X'-(CH_2-CH-O)_r-X'$, worin X' Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet, zu einem neuen Ring schliesst;

(d) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

dadurch gekennzeichnet, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von R_6OH und BF_3 umsetzt und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt;

(e) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

dadurch gekennzeichnet, dass man das in (b) erhaltene Epoxid in Gegenwart von BF_3 und beispielsweise $NaBH_4$ hydriert und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt;

(f) R_3 einen Rest der Formel Ia darstellt,

dadurch gekennzeichnet, dass man das in (b) erhaltene Epoxid mit einem entsprechenden Grignard-Reagenz umsetzt und gegebenenfalls die freiwerdende Hydroxylgruppe in einen Ether oder Ester überführt; oder

(g) R_3 einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet,

dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVb



worin R_{14} und R_{15} die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe steht, nach einem der in (a) bis (f) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und den Basenrest B durch Substitution einführt; gegebenenfalls die Schutzgruppen R_{14} und R_{15} abspaltet und den die phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest einführt.

32. Verwendung der Verbindungen gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I oder die mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formeln I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden enthalten, wobei die Oligonukleotide aus 2 bis 200 Monomereinheiten bestehen.

33. Verwendung gemäß Anspruch 32 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 100 Monomereinheiten.

34. Verwendung gemäß Anspruch 33 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 50 Monomereinheiten.

35. Verwendung gemäß Anspruch 34 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 4 bis 30 Monomereinheiten.

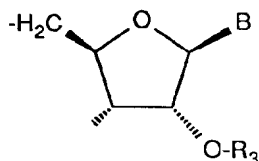
36. Verwendung gemäß Anspruch 32 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I.

37. Verwendung gemäß Anspruch 32 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I und Monomereinheiten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden.

38. Oligonukleotide der Formel V

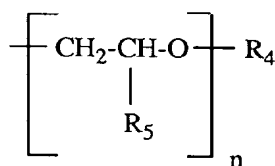


worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten; U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI bedeutet

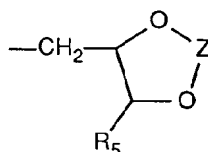


(VI)

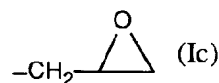
worin B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon darstellt; und R₃ einen Rest der Formel Ia, Ib oder Ic bedeutet



(Ia)



(Ib)



(Ic)

worin R₄ Wasserstoff, C₁-C₂₁-Alkyl, C₂-C₂₁-Alkenyl, C₂-C₂₁-Alkynyl oder -C(=O)-Alkyl; R₅ Wasserstoff, C₁-C₁₀-Alkyl, -CH₂-O-R₆ oder einen Rest der Formel Ib; R₆ Wasserstoff, C₁-C₂₂-Alkyl, C₃-C₂₁-Alkenyl, teilweise oder vollständig mit Fluor substituiertes C₁-C₁₀-Alkyl oder -[(CH₂)₂-O]_m-R₇; R₇ Wasserstoff oder C₁-C₂₁-Alkyl; Z -(CH₂)_p- oder -(CH₂-CH-O)_q-CH₂CH₂-, wobei Z im Fall von -CH₂- unsubstituiert oder mit einem oder mehreren C₁-C₁₀-Alkyl, C₅-C₆-Cycloalkyl oder unsubstituiertem oder mit C₁-C₄-Alkyl substituiertem Phenyl unabhängig voneinander substituiert sein kann; n eine Zahl von 1 bis 12; m eine Zahl von 1 bis 4; p eine Zahl von 1 bis 10; und q eine Zahl von 1 bis 4 bedeuten.

39. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Brückengruppe Y um -P(O)O[⊖]-, -P(O)S[⊖]-, -P(S)S[⊖]-, -P(O)R₁₆-, -P(O)NR₁₇R₁₈-, oder -CH₂- handelt, worin R₁₆ H oder C₁-C₆-Alkyl darstellt, und R₁₇ und R₁₈ unabhängig voneinander die Bedeutung von R₁₆ haben.

40. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei der Brückengruppe Y um -P(O)O[⊖]- handelt.

41. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 0 bis 100 steht.

42. Oligonukleotide gemäß Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 1 bis 50 steht.

43. Oligonukleotide gemäß Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 3 bis 29 steht.

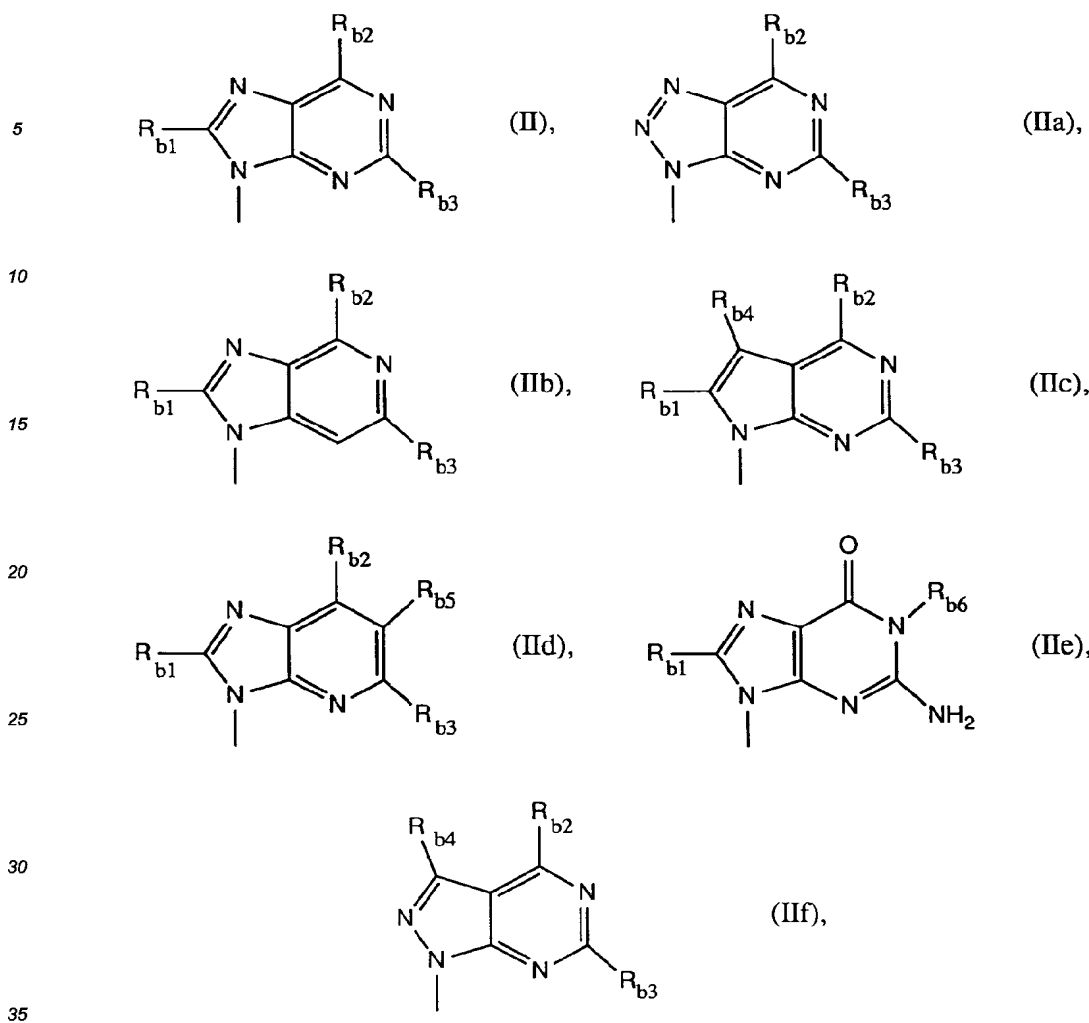
44. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI endständig und/oder in der Nukleotidsequenz gebunden sind.

45. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sind.

46. Oligonukleotide gemäß den Ansprüchen 44 und 45, dadurch gekennzeichnet, dass 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen.

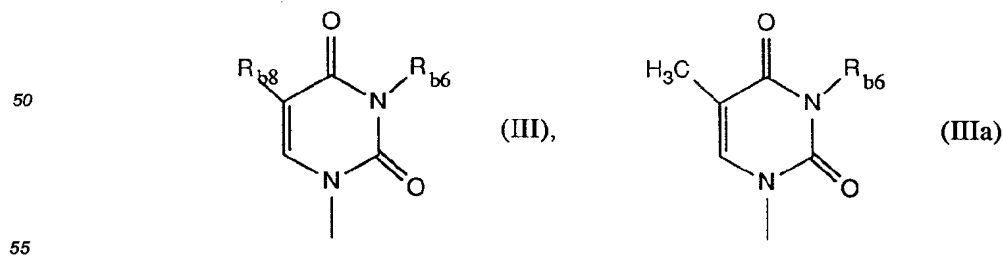
47. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass insgesamt 4 bis 30 Nukleosideinheiten und 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten sind.

48. Oligonukleotide gemäß Anspruch 38, worin B als Purinrest oder einem Analoges davon einen Rest der Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf darstellt,



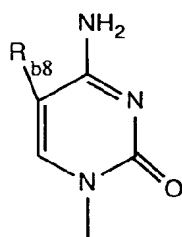
worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder -O-C₁-C₁₂-Alkyl steht, und R_{b2}, R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH₂, NHNH₂, NHOH, NHO-C₁-C₁₂-Alkyl, -N=CH-N(C₁-C₁₂-Alkyl)₂, -N=CH-N-Cycloalkyl, F, Cl, Br, C₁-C₁₂-Alkyl, Hydroxy-C₁-C₁₂-alkyl, Amino-C₁-C₁₂-alkyl, C₁-C₁₂-Alkoxy, Benzyloxy, C₁-C₁₂-Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder -C≡C-R_{b7}, R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C₁-C₄-Alkyl darstellen.

49. Oligonukleotide gemäss Anspruch 38, worin B einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,

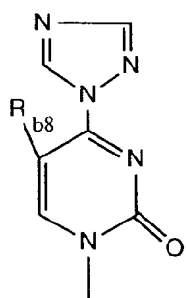


5

10



(IIIb),



(IIIc)

15

worin R_{b8} H oder C_1 - C_4 -Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, NHO - C_1 - C_{12} -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br, C_1 - C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1 - C_{12} -alkyl, Amino- C_1 - C_{12} -alkyl, C_1 - C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1 - C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C_1 - C_{12} -Alkenyl oder C_1 - C_{12} -Alkynyl bedeuten, und die NH_2 -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

20

50. Oligonukleotide gemäss Anspruch 38, worin R_3 einen Rest der Formel Ia bedeutet.

51. Oligonukleotide gemäss Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass n für einen Zahlenwert von 1 bis 8 steht.

25

52. Oligonukleotide gemäss Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass n für einen Zahlenwert von 1 bis 6 steht.

53. Oligonukleotide gemäss Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass R_4 Wasserstoff, C_1 - C_{21} -Alkyl, C_2 - C_{21} -Alkenyl oder C_2 - C_{21} -Alkynyl bedeutet.

30

54. Oligonukleotide gemäss Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass R_4 für Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl steht.

55. Oligonukleotide gemäss Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass R_5 Wasserstoff, C_1 - C_5 -Alkyl oder $-CH_2-OH$, $-CH_2-O-C_1-C_{22}$ -Alkyl oder $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_m-C_1-C_{10}$ -alkyl, worin m eine Zahl von 1 bis 4 ist, bedeutet.

35

56. Oligonukleotide gemäss Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, dass R_5 Wasserstoff, Methyl oder $-CH_2-OH$, $-CH_2-O-C_1-C_{22}$ -Alkyl oder $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_m-C_1-C_{10}$ -alkyl, worin m eine Zahl von 1 bis 4 ist, bedeutet.

40

57. Oligonukleotide gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 einen Rest der Formel Ib bedeutet.

58. Oligonukleotide gemäss Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, dass Z $-CH_2-$ oder substituiertes $-CH_2-$ bedeutet.

45

59. Oligonukleotide gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 einen Rest der Formel Ic bedeutet.

60. Verwendung der Oligonukleotide der Formel V als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.

50

61. Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Wechselwirkung mit Nukleotidsequenzen im Körper.

55

62. Pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formel V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial und gegebenenfalls Hilfsstoffe.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 94 81 0255

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 64, no. 3, 31. Januar 1966, Columbus, Ohio, US; abstract no. 3659a, S.M. ZHENODAROVA 'Isolation and properties of pyridinium and barium salts of O-butoxyethylidene derivatives of uridine 3'-phosphate' * Zusammenfassung * & IZV. AKAD. NAUK SSSR, SER. KHIM. 1965 Seiten 1667 - 9 ---	1,13,18, 21-27	C07H19/04 C07H21/02 A61K31/70
D,Y	ANTI-CANCER DRUG DESIGN Bd. 6 , 1991 Seiten 585 - 607 P.D.COOK 'Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides' * Seite 592 - Seite 595 * ---	1-62	
D,Y	WO-A-91 06556 (GILEAD SCIENCES) 16. Mai 1991 * Ansprüche 1,5,9,26,49 * * Seite 11, Zeile 33 - Seite 12, Zeile 11 * * Seite 27; Tabelle 1 * * Seite 13, Zeile 3 - Zeile 15 * -----	1-62	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5)
			C07H A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 14. September 1994	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)